



HAL
open science

Etude physicochimique de l'association d'un antibiotique avec un ciment apatitique pour la substitution osseuse

Hassan Noukrati

► To cite this version:

Hassan Noukrati. Etude physicochimique de l'association d'un antibiotique avec un ciment apatitique pour la substitution osseuse. Matériaux. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université Cadi Ayyad (Marrakech, Maroc). Faculté des sciences Semlalia, 2015. Français. NNT : 2015INPT0055 . tel-04235095

HAL Id: tel-04235095

<https://theses.hal.science/tel-04235095>

Submitted on 10 Oct 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Science et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par :

M. HASSAN NOUKRATI

le mardi 26 mai 2015

Titre :

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ASSOCIATION D'UN ANTIBIOTIQUE
AVEC UN CIMENT APATITIQUE POUR LA SUBSTITUTION OSSEUSE

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (C.I.R.I.M.A.T.)

Directeur(s) de Thèse :

MME CHRISTELE COMBES

M. ALLAL BARROUG

Rapporteurs :

M. HASSANE OUDADESSE, UNIVERSITE RENNES 1

Mme ZINEB HATIM, UNIVERSITE CHOUAIB DOUKKALI

Membre(s) du jury :

M. AHMED LEGROURI, UNIVERSITY OF GRAND-BASSAM, Président

M. ALLAL BARROUG, UNIV. DE CADI AYYAD MARRAKECH MAROC, Membre

Mme CHRISTELE COMBES, INP TOULOUSE, Membre

Mme SOPHIE CAZALBOU, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

M. NOUREDDINE MEZRIOUI, UNIV. DE CADI AYYAD MARRAKECH MAROC, Membre

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux et Environnement (LPCME) de la Faculté des Sciences Semlalia à l'Université cadi Ayyad de Marrakech et l'équipe de Phosphates, Pharmacotechnie et Biomatériaux (PPB) du CIRIMAT à l'Institut National Polytechnique de Toulouse. La direction de cette thèse a été assurée conjointement par le Professeur Christèle Combes et le Professeur Allal Barroug. Ce travail a bénéficié du support financier du programme Volubilis MA/11/263.

La réalisation de ce travail de recherche a été possible grâce à l'implication et au soutien de diverses personnes que je souhaite remercier ici, et à tous ceux qui ont, de près ou de loin, apporté leur contribution à la réalisation de mon projet de recherche.

Pour débiter, je tiens à remercier profondément mes directeurs de thèse : le professeur Christèle Combes et le professeur Allal Barroug. Je tiens à les remercier vivement pour m'avoir confié ce sujet de thèse et m'avoir orienté durant ces années avec beaucoup de patience et de professionnalisme. J'exprime aussi toute ma reconnaissance pour leur disponibilité et leur générosité. Sans leurs encouragements et aides je ne serai jamais arrivé à ce stade de formation.

J'adresse également mes plus sincères remerciements au professeur Christian Rey et à Sophie Cazalbou pour avoir participé à l'encadrement de ce travail. Merci pour votre grande disponibilité, votre gentillesse, votre soutien permanent et pour vos encouragements. Ce fut un grand plaisir et surtout un grand honneur de travailler avec vous durant ces années de thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent à Ahmed Legrouri, professeur à l'Université Internationale Grand-Bassam de Côte d'Ivoire, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

J'adresse toute ma reconnaissance à Zineb Hatim, professeur à la l'Université Chouaib Doukkali d'El Jadida, Hassane Oudadesse, professeur à l'Université de Rennes 1, et Noureddine Mezrioui, professeur à la l'Université Cadi Ayyad de Marrakech, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteur de ce travail ainsi que pour les remarques constructives à l'égard du contenu du manuscrit.

Je remercie également Dr. Said Zayane, chirurgien orthopédiste et traumatologue à Marrakech, pour l'honneur qu'il me fait de participer au jury de thèse et pour les moments de réflexion concernant l'aspect appliqué de cette étude.

Je remercie très sincèrement Christine Roques et Julien Grimoud, du Laboratoire de Génie Chimique à Toulouse, pour la réalisation des essais préliminaires antibactériens *in vitro* et pour leur aide dans l'interprétation des résultats obtenus.

J'exprime mes vifs remerciements aux permanents de l'équipe PPB : Christophe, David, Ghislaine, Jérémy, Audrey, Fabien, Sophie, Stéphanie pour leur gentillesse, le

partage des connaissances scientifiques, leur soutien, l'esprit d'équipe et la joie de vivre qu'ils font rayonner autour d'eux.

Je souhaite également adresser mes remerciements au personnel technique du laboratoire pour leur soutien et leur contribution à ce travail : Gérard Dechambre, pour les essais mécaniques, Françoise Bosc pour le dosage du calcium. Je remercie également Cédric Charvillat et Olivier Marsan pour leur aide et leur disponibilité. J'ai apprécié de travailler avec chacun d'entre vous.

Merci aussi à Dominique Bonsirven et à Jany pour votre disponibilité et votre efficacité.

Un grand merci à tous les doctorants de l'équipe PPB que j'ai connus durant mes séjours à Toulouse : Farid, Imane, Nicolas, Patricia, Sylvaine, Anne, Pierre, Manu, Maela, Marie-Alix, Laura, Kemie, Frédéric, Audric. C'est appréciable de savoir qu'on peut compter les uns sur les autres et s'entraider mais également partager plus que le boulot.

Merci aussi à tous les doctorants « mémodocs » et plus particulièrement Pierre-luc mon khoya ☺ et Sabrina. J'ai été très heureux de partager le bureau avec vous. Merci pour le bel esprit de solidarité dans le bureau, de soutien et de compréhension, d'encouragements mutuels ; merci pour tout le côté social et l'humour qui rend la vie tellement plus légère au quotidien.

Mes remerciements s'adressent également aux stagiaires que j'ai rencontrés durant ma thèse, et plus particulièrement : Eve, Achraf, Nadia, et Hamid. Je tiens aussi à remercier Marie Laveissière qui a pu réaliser quelques tests complémentaires à mes résultats.

Le travail c'est important mais il n'y a pas que ça dans la vie bien sûr et ces années ne se seraient pas aussi bien passées sans la présence d'autres personnes, extérieures au laboratoire. Je souhaite remercier mes amis, Abdelouahd, Ziko, Jamix, Nabila, Adrien, Abdellah, Fatah, Karim, Hassan, Kamal, Hamid, Ridouane et Samiha pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant ces années de thèse. Merci d'avoir été là...

Enfin je tiens à remercier mes parents, mes sœurs, mon frère, ainsi que l'ensemble de ma famille pour leur soutien.

RESUME

L'intérêt pour le développement de ciments osseux à base de phosphates de calcium (CaP) en tant que systèmes de délivrance de médicament a augmenté en raison de sa capacité à être injecté et à permettre un traitement local et contrôlé des maladies ou défauts osseux. A cette fin, nous nous sommes intéressés à la formulation d'un ciment mixte à base de carbonate et phosphate de calcium (CaCO_3 -CaP) chargé avec différentes teneurs (3, 6 et 9% calculé par rapport à la masse de la phase solide du ciment) en acide fusidique (AF), composé pratiquement insoluble dans l'eau, ou en son sel hydrosoluble, le fusidate de sodium (SF).

L'influence de l'incorporation de l'antibiotique sous ces deux formes sur les propriétés physicochimiques (temps et cinétique de prise, résistance à la compression, injectabilité) et la microstructure (porosité) du ciment ainsi que sur la libération *in vitro* de ce médicament a été étudiée. L'effet de la quantité d'eau (rapport liquide/solide (L/S)) utilisée pour l'élaboration du ciment sur ces propriétés a été également examiné.

Les résultats obtenus ont révélé que l'ajout de l'antibiotique n'avait aucun effet sur la composition minérale du ciment durci : la réaction de prise donne lieu à la formation d'une apatite carbonatée analogue au minéral osseux. Nous avons observé que le temps de prise du ciment a été prolongé par l'addition d'AF, tandis que la présence de SF le réduit et cet effet est dose dépendant. L'utilisation d'un accélérateur de prise (Na_2HPO_4) réduit le temps de prise d'une manière significative, et a permis d'atteindre un temps de prise de l'ordre de 25 à 30 minutes ; celui-ci se situe dans une gamme compatible avec une application en chirurgie orthopédique ou dentaire.

Ce travail a également permis de mettre en évidence que l'incorporation de l'antibiotique dans le ciment s'accompagne d'une diminution de la porosité et de la résistance à la compression. En outre, l'augmentation du rapport liquide-solide (L/S) se traduit par une augmentation du temps de prise, de la porosité des ciments et par une diminution de la résistance à la compression.

Les mesures d'injectabilité des ciments étudiés ont montré que la charge nécessaire pour l'extrusion de la pâte est diminuée par l'ajout d'AF (injectabilité améliorée) et que cet effet est amplifié en présence de SF. Le phénomène de séparation de phases qui limitait l'injectabilité de la pâte du ciment de référence a été supprimé par l'ajout de 9 % de SF et par l'augmentation de la quantité d'eau utilisée (L/S plus élevé) pour l'élaboration du ciment.

Les essais de libération *in vitro* du principe actif dans une solution de NaCl 0.9 % à 37°C pendant un mois montrent que la libération est prolongée et ce quels que soient la forme de l'antibiotique et le rapport L/S. Le taux libéré est lié à la porosité totale et à la taille des pores du ciment ainsi qu'à la solubilité de l'antibiotique. Les quantités libérées par jour sont de l'ordre de 0.5 à 2 mg/L. La libération du médicament a été modélisée en utilisant les équations de Korsmeyer-Peppas, de Higuchi ou de Kopcha. Les résultats ont montré que la libération du médicament est contrôlée principalement par un mécanisme de diffusion.

Enfin, l'efficacité *in vitro* du système de délivrance préparé a été évaluée à travers des essais microbiologiques réalisés avec les ciments chargés en antibiotique ; les résultats préliminaires obtenus ont montré une activité anti-biofilm faible sur la souche bactérienne de type *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : Biomatériaux, substitut osseux, ciment, apatite, antibiotique, libération, infection osseuse.

ABSTRACT

The interest in developing calcium phosphate cements as a drug delivery system has risen because of its capability to be injectable and to enable local and controlled treatment of bone disease or defects.

In the present work, we are interested in the development of a mixed cement based on calcium phosphate and carbonate ($\text{CaCO}_3\text{-CaP}$) loaded with different concentrations (3, 6 and 9% calculated on the weight of the cement solid phase) of fusidic acid (FA) compound substantially insoluble in water, or its water soluble salt, sodium fusidate (SF).

The influence of the incorporation of both forms of antibiotic on the physicochemical properties (setting time and setting reaction kinetics, compressive strength, injectability) and the microstructure (porosity) of the cement as well as on the *in vitro* release of this drug was studied. The effect of the amount of water (liquid / solid ratio (L / S)) used for the preparation of cement on these properties was also examined.

The results obtained showed that the addition of the antibiotic had no effect on the final composition of the hardened cement: the setting reaction leads to the formation of a carbonated apatite analogous to bone mineral.

The setting time of the cement was prolonged by the addition of AF, while it is reduced in the presence of SF and we showed that this effect is dose-dependent. The introduction of an accelerator (Na_2HPO_4) in the cement formulation reduces the setting time significantly in a range (25 to 30 minutes) which is adapted to orthopedic and dental applications.

This work has also demonstrated that the incorporation of the antibiotic in the cement is accompanied by a decrease in the cement porosity and resistance to compression. In addition, increasing the liquid to solid ratio induced an increase in the setting time and in the porosity of the cement whereas the cement compressive strength is decreased.

Measurements conducted on cement injectability have shown that the load required to extrude the paste is reduced by the addition of AF (improved injectability) and this effect is enhanced in the presence of SF. The phase separation phenomenon that limits the injectability of the reference cement paste was suppressed by the addition of 9% of SF and by increasing the amount of water (higher L / S) used for the preparation of cement.

In vitro release test of the antibiotic in NaCl 0.9% solution at 37 °C over one month showed that the release is sustained regardless of the form of the antibiotic and of the L / S ratio. The released rate is related to the total porosity and pore size of the cement as well as the solubility of the antibiotic. The amounts released per day are in the range of 0.5 to 2 mg / L. Drug release was modeled using the Korsmeyer-Peppas, Higuchi or Kopcha equations. These modelisations showed that the drug release is mainly controlled by a diffusion mechanism.

Finally, the *in vitro* efficiency of the prepared drug delivery systems was evaluated through microbiological tests on antibiotic-loaded cements; the preliminary results obtained showed a weak anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* bacterial strain.

Keywords: Biomaterials, bone substitute, cement, apatite, antibiotic, release, bone infection.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- LE TISSU OSSEUX	7
I-1- Structure et composition chimique de l'os	7
I-1-1- Structure	7
I-1-2- Composition de l'os	9
I-1-2-1- Phase organique	9
I-1-2-2- Phase minérale de l'os	10
I-1-2-3- Cellules osseuses	11
I-2- Remodelage osseux	11
I-3- Réparation osseuse : l'auto-cicatrisation	13
II- BIOMATERIAUX DE SUBSTITUTION OSSEUSE	15
II-1- Substituts osseux d'origine naturelle	15
II-2- Substituts osseux synthétiques	16
II-2-1- Céramiques	16
II-2-1- 1- Céramiques phosphocalciques	16
II-2-1- 1-1- Hydroxyapatite	16
II-2-1- 1-2- Phosphate tricalcique	17
II-2-1- 1-3- Biocéramiques phosphocalciques biphasiques	17
II-2-2- Ciments en tant que biomatériaux de comblement osseux	18
II-2-2- 1- Ciments acryliques	18
II-2-2- 2- Ciments phosphocalciques	18
III- INFECTIONS OSSEUSES ET TRAITEMENT	19
III-1- INFECTIONS OSSEUSE	19
III-2- TRAITEMENT DE L'INFECTION OSSEUSE	20
III-2-1- Traitement par voie systémique	21
III-2-2- Antibiothérapie locale	21
III-2-2-1- Ciments acryliques pour la délivrance locale d'antibiotique	22
III-2-2-2- Phosphates de calcium pour la délivrance locale d'antibiotiques	22
III-2-2-2-1- Association de l'antibiotique avec une biocéramique	23
III-2-2-2-2- Ciments phosphocalciques pour la délivrance locale d'antibiotique	24
III-3- Acide fusidique dans le traitement de l'infection osseuse	25
III-3-1- Propriétés de l'acide fusidique	25
III-3-2- Pharmacologie	26
III-3-3- L'acide fusidique dans les ciments	27
IV- ADSORPTION A L'INTERFACE SOLIDE-LIQUIDE	27
IV-1- Enjeu de l'étude des processus d'adsorption	27

IV-2- Adsorption	28
IV-2-1- Lois d'adsorption.....	28
IV-2-1-1- Isotherme de Freundlich.....	29
IV-2-1-2- Isotherme de Langmuir	29
IV-2-1-3- Isothermes Langmuir-Freundlich et Töth	29
IV-3- Adsorption de biomolécules par des phosphates de calcium apatitiques	30

CHAPITRE II

SYNTHESE ET CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DE PHOSPHATES ET DE CARBONATES DE CALCIUM

PARTIE A

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE PHOSPHATES DE CALCIUM APATITIQUES

I- HYDROXYAPATITE STOECHIOMETRIQUE	38
I-1- Synthèse	38
I-2- Caractérisation	39
I-2-1- Diffraction des rayons X	39
I-2-2- Spectroscopie Infrarouge.....	39
II- APATITE NANOCRISTALLINE CARBONATEE	42
II-1- Synthèse	42
II-2- Caractérisation	42
II-2-1- Diffraction des rayons X	42
II-2-2- Spectroscopie infrarouge.....	42

PARTIE B

SYNTHESE ET CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES POUDRES REACTIVES ET DU CIMENT DE REFERENCE

I- SYNTHESE ET CARACTERISATION DES POUDRES REACTIVES	48
I-1-Brushite	48
I-1-1- Introduction	48
I-1-2- Synthèse et caractérisation de la brushite	49
I-1-2-1- Synthèse	49
I-1-2-2- Caractérisation de la brushite	50
I-1-2-2-1- Diffraction des rayons X.....	50
I-1-2-2-2- Spectroscopie infrarouge	50
I-1-2-2-3- Microscopie électronique à balayage.....	53
I-2- Vatérite	53
I-2-1- Introduction	53
I-2-2- Synthèse et caractérisation de la vatérite.....	54
I-2-2-1- Synthèse	54
I-2-2-2- Caractérisation.....	56

I-2-2-2-1- Diffraction des rayons X.....	56
I-2-2-2-2- Spectroscopie infrarouge	56
I-2-2-2-3- Microscopie électronique à balayage.....	58
II- ETUDE DU CIMENT DE REFERENCE	58
II-1- Elaboration du ciment de référence	59
II-2- Caractérisation du ciment de référence	59
II-2-1- Diffraction des rayons X	59
II-2-2- Spectroscopie infrarouge.....	61
II-2-3- Microscopie électronique à balayage	64
II-3-Etude de la cinétique de prise du ciment	67
II-3-1- Protocole	67
II-3-1-1- Analyse par spectroscopie infrarouge.....	67
II-3-1-2- Analyse par diffraction des rayons X	69
CONCLUSION	73

CHAPITRE III

ASSOCIATION DE PHOSPHATE DE CALCIUM AVEC UN ANTIBIOTIQUE : CAS DE L'ACIDE FUSIDIQUE & FUSIDATE DE SODIUM

PARTIE A

ETUDE PRELIMINAIRE DE L'INTERACTION ENTRE APATITES ET FUSIDATE DE SODIUM

INTRODUCTION	80
I- Caractérisation de l'acide fusidique et du fusidate de sodium	80
I-1- Spectroscopie infrarouge	81
I-2- Méthode de dosage de l'antibiotique	84
I-3- Validation de la méthode de dosage.....	84
II- ETUDE DE L'ADSORPTION DU FUSIDATE SUR DES SUPPORTS APATITIQUES	86
II-1- Matériaux et méthodes	86
II-1-1- Protocole expérimental.....	86
II-1-2- Etude d'adsorption	86
II-2- Résultats	87
II-2-1- Etude de la cinétique d'adsorption.....	87
II-2-2- Isotherme d'adsorption.....	88
II-2-2-3- Influence de la composition chimique du milieu sur l'adsorption de fusidate	92
II-2-2-3-1- Influence du pH sur l'adsorption.....	92
II-2-2-3-2- Influence des ions phosphate.....	92
II-2-2-3-2- Influence des ions carbonate	92
II-2-3- Caractérisation du support après adsorption par spectroscopie infrarouge.....	95
II-3- DISCUSSION	96

CONCLUSION.....	97
-----------------	----

PARTIE B
CIMENTS CHARGES EN ANTIBIOTIQUE :
ELABORATION & CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE

INTRODUCTION.....	100
I- ELABORATION DU CIMENT.....	100
I-1- Protocole expérimental	100
II- CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE	101
II-1- Caractérisation par diffraction des rayons X	101
II-2- Spectroscopie infrarouge.....	101
II-3- Etude de la cinétique de prise du ciment chargé en antibiotique.....	104
II-3-1- Protocole expérimental.....	104
II-3-2- Résultats et discussion.....	104
II-3-2-1- Influence de l'incorporation du principe actif	104
II-3-2-2- Influence du rapport L/S sur la cinétique de prise	110
II-4- Temps de prise	114
II-4-1- Technique de mesure.....	114
II-4-2- Protocole expérimental.....	114
II-4-3- Résultats et discussion.....	115
II-4-3-1- Influence de l'antibiotique sur le temps de prise	115
II-4-3-2- Influence du rapport L/S sur le temps de prise	116
II-4-3-3- Influence de l'hydrogénophosphate de sodium sur le temps de prise	117
II-5- Etude de l'injectabilité de la pâte	120
II-5-2- Protocole expérimental.....	120
II-5-3- Résultats et discussion.....	121
II-5-3-1- Ciment de référence	121
III-5-3-2- Influence de l'antibiotique sur l'injectabilité de la pâte	122
II-5-3-3- Influence de la nature de l'antibiotique sur l'injectabilité de la pâte.....	122
II-5-3-4- Influence du rapport L/S sur l'injectabilité de la pâte	123
II-6- Porosité du ciment	126
II-6-1- Effet de la présence d'antibiotique sur la porosité du ciment	126
II-6-2- Effet du rapport L/S sur la porosité.....	128
II-7- Etude des propriétés mécaniques	131
II-7-1- Propriétés mécaniques des ciments secs	131
II-7-1-1- Protocole expérimental	131
II-7-1-1-1- Test de résistance à la compression.....	131
II-7-1-1-2- Préparation des échantillons	132
II-7-1-2- Résultats et discussion	132
II-7-1-2-1- Influence de l'antibiotique sur les propriétés mécaniques	132
II-7-1-2-2- Influence du rapport L/S sur les propriétés mécaniques	134

II-7-2- Propriétés mécaniques des ciments humides	134
II-7-2-1- Protocole expérimental	134
II-7-2-2- Résultats et discussion	135
CONCLUSION	139

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ANTIBIOTIQUE ET EVALUATION DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES

PARTIE A

ETUDE DE LA CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ANTIBIOTIQUE

INTRODUCTION	146
I- LES DIFFERENTES MODELES DE LIBERATION DE MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE	147
II- PROTOCOLE EXPERIMENTAL	149
III- RESULTATS ET DISCUSSION	150
III-1- Etude à partir de ciments secs	150
III-1-1- Influence du rapport L/S	150
III-1-2- Influence de la voie d'introduction de l'antibiotique.....	153
III-1-3- Influence de la dose d'antibiotique.....	156
III-2- Etude à partir de ciments frais	159
III-2-1- Influence de l'état humide du ciment	159
III-2-2- Influence de la dose d'antibiotique.....	163
III-2-3- Influence de la nature de l'antibiotique	165
III-2-4- Influence du rapport L/S	167
III-3- Etude de la dissolution du ciment	170
III-3-1- Influence de l'état du ciment sur sa dégradation	170
III-3-2- Influence du rapport L/S sur la dissolution du ciment.....	172
III-4- Caractérisation des ciments après le test de dissolution	174
III-4-1- Diffraction des rayons X.....	174
III-4-2- Spectroscopie infrarouge	174
CONCLUSION	178

PARTIE B

EVALUATION PRELIMINAIRE DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES DU CIMENT

INTRODUCTION	182
I- Protocoles expérimentaux	182
I-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrice et bactéricide de l'antibiotique	182
I-2- Essai anti-biofilm	183
I-2-1- Préparation de pastilles de ciments.....	183

II-2-2- Test anti-biofilm.....	184
II- Résultats et discussion	184
II-1- Détermination des CMI et CMB	184
I-2- Evaluation de l'activité antibactérienne des ciments	185
CONCLUSION.....	186
CONCLUSION GENERALE.....	188
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	194
ANNEXES.....	210

Abréviations

HA	Hydroxyapatite phosphocalcique
BCP	Phosphate de calcium biphasique (biphasic calcium phosphate)
CaP	Phosphates de calcium (de manière générique)
CPC	Ciments phosphocalciques (de manière générique)
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
TCP	Phosphate tricalcique (tricalcium phosphate) : α -TCP ou β -TCP
V	Vatérite
Br	Brushite, (phosphate de calcium dihydraté (DCPD) ou brushite)
SF	Fusidate de sodium (Sodium fusidate)
FA	Acide fusidique (Fusidic acid)
CSF	Ciment chargé avec le fusidate de sodium
CFA	Ciment chargé avec l'acide fusidique
DRX	Diffraction des rayons X
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transformed InfraRed)
MEB	Microscopie électronique à balayage
L/S	Rapport massique de la phase liquide (L) et (S) solide
BBM	Bouillon biofilm modifié
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
UFC	Unité formant colonie

INTRODUCTION GENERALE

La restauration des pertes de substance osseuse, d'origine traumatique ou pathologique, est une des grandes difficultés rencontrées par les praticiens hospitaliers officiant notamment dans les pays en voie de développement. Les attentes des chirurgiens ces dernières années ne se limitent plus seulement à utiliser des substituts de comblement des pertes de substances osseuses, mais aspirent en outre à des matériaux de comblement capables de traiter certaines réactions néfastes de l'organisme et prévenir certaines pathologies infectieuses sans avoir recours à des traitements longs et quelquefois inefficaces. Ainsi, la recherche de biomatériaux de substitution osseuse associant un antibiotique à libération contrôlée est d'un grand intérêt en vue de lutter contre les infections nosocomiales qui peuvent faire suite à une intervention chirurgicale orthopédique par exemple.

Une grande variété de substituts de comblement et de réparation osseuse ont été développés en réponse à la multiplicité des pathologies et des traumatismes qui nécessitent leur utilisation. Parmi les divers matériaux destinés pour des applications en tant que biomatériaux, les ciments phosphocalciques (CPC) ont fait l'objet de nombreuses études durant les dernières décennies en tant que matériaux pour le comblement, la substitution et la reconstruction osseuse notamment en chirurgie dentaire et orthopédique, et ce en raison de la similitude de leurs compositions et propriétés physico-chimiques avec la phase minérale de l'os. Ces biomatériaux présentent plusieurs avantages : ils sont bioactifs, ostéoconducteurs, résorbables. Se présentant sous forme d'une pâte, les CPC sont facilement manipulés et mis en forme et dans certains cas, peuvent être injectés dans la zone du défaut osseux à combler, non seulement pour éviter les procédures chirurgicales invasives mais aussi pour s'adapter à la forme du défaut. Contrairement aux céramiques classiques élaborées à haute température ou bien aux ciments acryliques qui sont largement utilisés en chirurgie orthopédique, la réaction de prise des CPC se fait à température ambiante, ce qui offre la possibilité d'incorporer dans la formulation des molécules biologiquement actives, et en fait ainsi de bons candidats pour la délivrance de médicaments *in situ*.

L'objectif de ce travail est d'associer ce type de ciment minéral à un antibiotique permettant d'une part la substitution osseuse, et d'autre part de lutter contre les infections nosocomiales et/ou post-opératoires par une libération locale contrôlée de l'antibiotique. La partie fondamentale de ce travail vise à identifier les modifications chimiques et texturales des ciments induites par l'introduction du principe actif et l'influence que celles-ci peuvent avoir sur la cinétique de libération de l'agent thérapeutique ; la partie appliquée de l'étude a pour but d'élaborer un ciment à base d'apatite biomimétique qui possède des propriétés bactéricides et fongicides.

Le support de l'antibiotique sur lequel nous avons travaillé est un ciment mixte préparé à partir d'un phosphate de calcium (CaP), la brushite, et d'une variété métastable de carbonate de calcium (CaCO₃), la vaterite ; ce dernier composé présente une solubilité supérieure aux

autres variétés de carbonate de calcium anhydres et aux phosphates de calcium, ce qui devrait conduire à une résorption plus rapide de ce ciment $\text{CaCO}_3\text{-CaP}$ *in vivo*.

Le principe actif que nous avons choisi d'introduire dans ce ciment est un antibiotique qui présente des propriétés bactéricides et fongicides à spectre large et qui présente une excellente pénétration osseuse. Outre son activité thérapeutique, cet antibiotique possède l'avantage de se présenter sous deux formes différentes qui présentent des solubilités différentes : le fusidate de sodium (SF) qui est soluble en phase aqueuse et l'acide fusidique (FA), qui lui, est pratiquement insoluble en milieu aqueux.

Le travail de recherche présenté dans le cadre de cette thèse s'articule autour de quatre chapitres. Le premier fait l'objet de généralités sur le tissu osseux, les substituts osseux utilisés dans le comblement de pertes osseuses, les infections osseuses et leurs traitements en se focalisant sur les antibiotiques et en particulier l'acide fusidique et le fusidate de sodium utilisés dans cette étude. Il présente également un aperçu sur le processus d'adsorption et les travaux réalisés sur la réactivité de surface des apatites.

La première partie du second chapitre porte sur l'élaboration et la caractérisation d'apatites, hydroxyapatite et apatite nanocristalline, qui serviront comme supports pour l'étude d'adsorption ainsi que des deux réactifs, brushite et vaterite, qui rentrent dans l'élaboration du ciment $\text{CaCO}_3\text{-CaP}$ étudié dans ce travail. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à l'élaboration et la caractérisation des propriétés physico-chimiques du ciment de référence (sans antibiotique).

Le chapitre trois est dédié à l'association de l'antibiotique avec les phosphates de calcium élaborés. La première partie examine l'interaction du fusidate de sodium avec les apatites de synthèse afin de spécifier le mode d'association de l'antibiotique avec les matériaux examinés. La seconde partie porte sur la préparation de ciments chargés en antibiotique (acide fusidique ou fusidate de sodium) et examine l'influence de la méthode d'incorporation de l'antibiotique (forme liquide ou solide), de sa concentration et également du rapport liquide/solide (L/S) sur les propriétés physico-chimiques du ciment obtenu.

Le quatrième chapitre comporte deux parties : la première exposera l'étude *in vitro* de la cinétique de libération de l'antibiotique à partir de ciments formulés dans diverses conditions et la deuxième partie de ce chapitre portera sur l'étude préliminaire de l'activité antibactérienne des ciments chargés en antibiotique préparés et caractérisés dans ce travail.

Une conclusion générale sera présentée à la fin du manuscrit pour résumer les résultats obtenus avec le système ciment-antibiotique élaboré et ouvre des perspectives pour la suite des recherches à entreprendre pour compléter le travail réalisé.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux (PPB) de l'Institut Carnot CIRIMAT à Toulouse (France) et le Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux et Environnement (LPCME) de la Faculté des Sciences de Semlalia de Marrakech (Maroc) et d'une convention de co-tutelle entre cette université et l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Le tissu osseux présente des fonctions et une composition ainsi qu'une capacité de renouvellement permanente qui lui sont caractéristiques. La capacité de l'os à se renouveler tout au long de la vie permet de cicatriser des défauts ou des fractures lorsque ceux-ci sont de petite taille. Mais dans certains cas, le remodelage seul ne suffit plus et nécessite l'implantation d'un biomatériau de comblement, naturel ou synthétique, pour remplacer l'os manquant, et, dans la mesure du possible, servir de support à un remodelage du biomatériau lui-même dans le but de reformer de l'os.

Nous présenterons en premier lieu quelques notions générales sur l'os et les biomatériaux de comblement osseux. Nous aborderons ensuite l'infection du tissu osseux suite à l'implantation de biomatériaux ainsi que son traitement par des antibiotiques. Les biomatériaux incluant des antibiotiques, et plus particulièrement les ciments phosphocalciques seront par la suite détaillés; nous ferons une revue de l'état de l'art sur l'acide fusidique et le fusidate de sodium, antibiotiques choisis dans le cadre de ce travail. Nous présenterons enfin les propriétés d'adsorption des phosphates de calcium d'intérêt biologique et les lois qui gouvernent les processus à l'interface de ces matériaux.

I- LE TISSU OSSEUX

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dont la substance extracellulaire est minéralisée. Il constitue la partie du corps humain la plus résistante et rigide. Il est le principal constituant du squelette, avec les tissus cartilagineux. Le squelette exerce plusieurs rôles fondamentaux :

- Un rôle de soutien mécanique : les os constituent une structure rigide servant de support aux tissus mous et de point d'attache aux tendons de la plupart des muscles. Le squelette est la charpente de l'organisme.

- Un rôle de protection : les os protègent de nombreux organes internes tels que le cerveau, les poumons et la moelle épinière contre les coups et traumatismes.

- Un rôle de réservoir d'ions minéraux : le tissu osseux contribue notamment à maintenir la concentration de calcium et phosphate constante dans le sang.

- Un rôle dans la formation des cellules sanguines : dans l'espace médullaire des os, sont produits les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes au cours du processus de l'hématopoïèse (processus physiologique qui assure le renouvellement des cellules sanguines et qui se produit quotidiennement dans l'organisme) : c'est la fonction « hématopoïétique » de l'os.

I-1- Structure et composition chimique de l'os

I-1-1- Structure

Le squelette humain se compose d'environ 206 os, reliés entre eux par des articulations, dont la taille, la forme et l'emplacement diffèrent selon leur fonction dans le squelette. Les os se classent selon différentes catégories, l'ensemble formant le squelette humain (Figure I-1) :

- Les os longs tels que ceux du bras (l'humérus), de la cuisse (fémur), ou de la jambe (Tibia-péroné) sont constitués de deux extrémités renflées, participant aux articulations. Ces extrémités sont appelées épiphyses. Elles sont reliées au corps de l'os, partie la plus longue qui s'appelle la diaphyse, avec des zones jonctionnelles de part et d'autre, appelées métaphyses. Ce sont ces métaphyses qui constituent le siège de prédilection des pertes de substance nécessitant le remplissage par des biomatériaux.
- Les os courts qui ont leurs trois dimensions à peu près égales, tels que ceux du poignet ou du cou-de-pied.
- Les os plats, tels que ceux du crâne.
- Les os irréguliers et les os sésamoïdes.

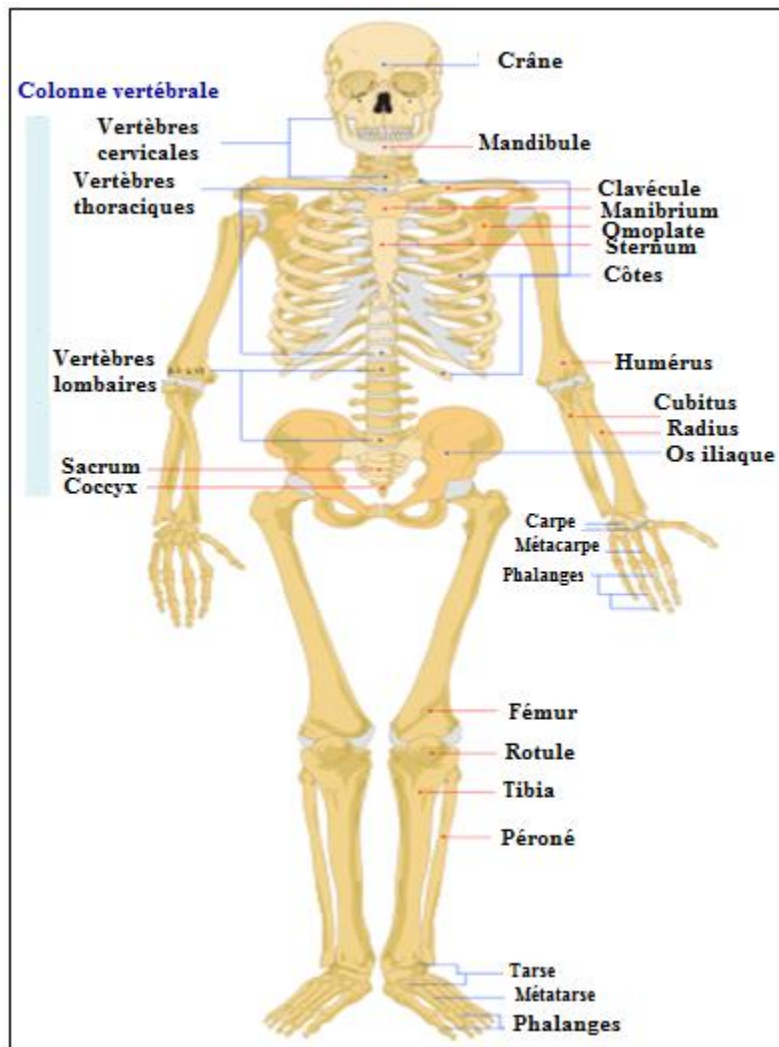


Figure I-1 : Représentation d'un squelette humain (vue de face) et des différents os qui le constituent¹.

¹ http://www.wikanatomie.com/squelette_humain.php (Consulté le 13 mars 2015)

Suivant la partie de l'os considérée on distingue deux types : l'os compact, appelé aussi os cortical, et l'os spongieux (Figure I-2).

L'os spongieux ou trabéculaire comme son nom l'indique, présente une porosité et donc une surface plus importante que l'os compact. Il est formé de tiges ou travées de soutien et occupe l'intérieur des vertèbres, du bassin, des os plats et des extrémités des os longs. Il constitue 20 % du squelette. Il est riche en cellules conjonctives adipeuses et en éléments sanguins.

L'os cortical ou compact compose les 80 % restants du squelette et est situé principalement dans les os longs. Se prolongeant sur toute la périphérie de l'os, il protège sa partie interne. Au cœur de ce cylindre compact, dans la *cavité médullaire*, se trouve la *moelle jaune* constituée principalement de tissu adipeux

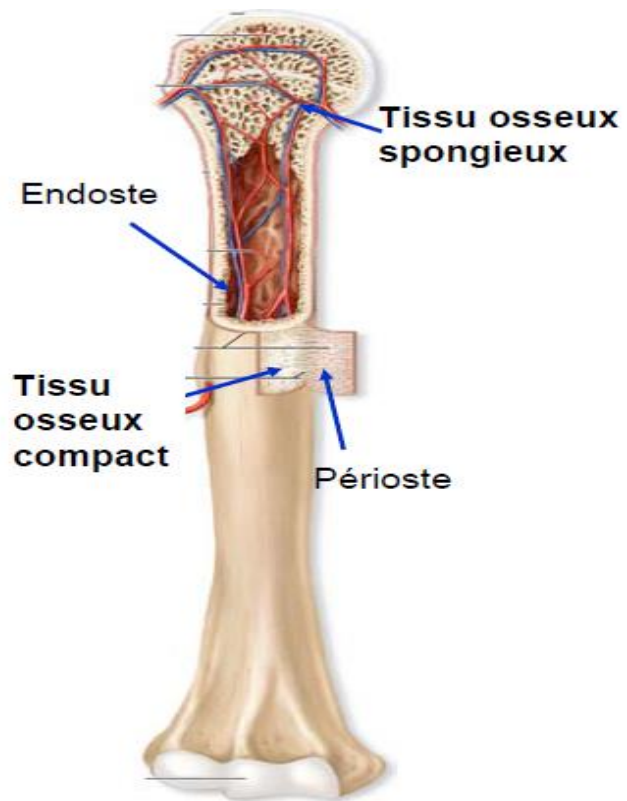


Figure I-2 : Représentation de l'os spongieux et cortical².

I-1-2- Composition de l'os

L'os est un tissu conjonctif spécialisé dans lequel sont associées une phase minérale sous la forme de cristaux de phosphate de calcium de structure apatitique (ou apatite) et une matrice organique fibreuse [Giudicelli et Souberbielle, 1998]. L'os est un matériau composite constitué d'une phase organique, d'une phase minérale et d'eau qui représentent respectivement environ 25, 65 et 10 % de la masse osseuse [Aoki, 1994].

I-1-2-1- Phase organique

La matrice organique est constituée principalement de fibres de collagène (90 %) qui sont associées entre elles et constituent l'architecture du tissu osseux. Le collagène de type I y prédomine très nettement, suivi d'une proportion beaucoup plus faible de collagène de type V et III qui participent à l'organisation de cette matrice [Niyibizi et Eyre, 1994]. Cette structure collagénique assure la visco-élasticité de l'os alors que le minéral qui se dépose à la surface et

² <http://pdfmanual4.com/tissu-osseux-i-cellules-et-matrice-extracellulaire/> (Consulté mars 2015)

entre les fibres de collagène est responsable de la rigidité du tissu. L'orientation et la composition de ces fibres qui régulent la quantité et l'orientation du minéral déposé, conditionnent donc la résistance mécanique du tissu osseux [Viguet-Carrin et al., 2006].

La matrice organique contient également des protéines non-collagéniques qui participent à la formation d'os et à sa régulation. Ces protéines sont nombreuses et assurent des fonctions variées. Plusieurs d'entre elles jouent un rôle sur l'organisation de la matrice et sa minéralisation (protéoglycanes, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine, phosphatase alcaline...). D'autres protéines (protéoglycanes, protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), ostéoprotégérine...) peuvent avoir une action, directe ou indirecte, sur l'activité des ostéoblastes et/ou des ostéoclastes qui sont les cellules respectivement en charge de la formation ou de la résorption osseuse. Des protéines caractéristiques du remodelage osseux (tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) et de la vascularisation (vascular endothelial growth factor : VEGF) sont aussi présentes [Schmidmaier et al., 2006, Lamoureux et al., 2007; Schreiweis et al., 2007].

La synthèse du collagène de type I constitue la première étape de la formation du tissu osseux supportant la minéralisation par étapes successives. Les fibres de collagène subissent au niveau de l'os un processus continu de synthèse et de dégradation intervenant dans le cycle de remodelage du tissu.

I-1-2-2- Phase minérale de l'os

La fraction minérale des tissus calcifiés est essentiellement constituée de phosphate et de calcium, associés à des groupements carbonates. Le minéral osseux est composé de cristaux sous forme de fines plaquettes d'apatite de taille nanométrique qui se déposent parallèlement aux fibres de collagène [Kuhn et al., 2008]. Longtemps considéré comme de l'hydroxyapatite substituée, le minéral osseux correspond en fait à une apatite carbonatée déficiente en ions calcium et hydroxyde, carbonatée, contenant des ions HPO_4^{2-} et des lacunes dans les sites anioniques monovalents. La composition moyenne du minéral osseux peut être représentée par la formule chimique suivante [Legros et al., 1987] :



Cette formule a été ajustée sur la base d'analyses spectroscopiques [Rey et al., 1989] et est devenue :



Cette apatite nanocristalline déficiente en calcium constitutive de la phase minérale de l'os possède une couche hydratée qui contient des ions labiles à la surface des nanocristaux (Figure I-3); cette couche hydratée n'existe pas dans le cas des apatites bien cristallisées [Rey et al., 2007]. Cette couche hydratée est composée d'ions majoritairement bivalents et recouvre le cœur apatitique du cristal constitué d'ions CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} dans des environnements apatitiques bien identifiés [Rey et al., 1989 ; Eichert et al., 2002]. Cette

couche hydratée, qui évolue au cours du temps, serait responsable de la très grande réactivité de surface des apatites biologiques.

Ces apatites présentent de très fortes capacités d'échanges ioniques et d'adsorption de protéines, ce qui leur permet d'interagir facilement avec les fluides biologiques. Ces propriétés pourraient être liées à la présence de cette couche hydratée, qui contient des espèces ioniques relativement mobiles et facilement échangeables (Figure I-3) [Cazalbou et al., 2000, Rey et al., 2007 ; Errassifi et al., 2010].

I-1-2-3- Cellules osseuses

Le tissu osseux contient différents types de cellules [Tortora et al., 2007; Libouban, 2008]:

- Ostéoblastes : ce sont des cellules osseuses immatures, responsables de la synthèse d'une substance appelée ostéoïde, substance organique qui va ensuite se minéraliser rapidement en emprisonnant les ostéoblastes pour former l'os. Ils sont situés à la surface des travées osseuses et dans les lacunes de résorption de l'os compact. Leur rôle est de synthétiser les éléments de la matrice osseuse et de permettre sa calcification.
- Ostéocytes : ce sont des ostéoblastes qui ont été progressivement emprisonnés par la matrice qu'ils ont élaborée. Elles sont enfermées dans une petite cavité, l'ostéoplaste, et communiquent avec les ostéocytes voisins par de fins prolongements cytoplasmiques. Ils détectent les tensions mécaniques au sein de l'os et participent au remodelage osseux.
- Ostéoclastes : ce sont des cellules multinucléées issues de monocytes en circulation (type de globules blancs). Elles opèrent à des pH acides, ce qui entraîne d'une part une solubilisation du minéral (résorption osseuse), et d'autre part l'activation d'enzymes lysosomiales qui dégradent la matrice organique.

I-2- Remodelage osseux

Le remodelage osseux est le processus physiologique qui permet le renouvellement de la matrice osseuse. Ce processus est réglé au niveau local, puisqu'il survient successivement au sein de chacune des unités fonctionnelles. Le remodelage fait intervenir deux types principaux de cellules osseuses : les ostéoclastes et les ostéoblastes. La figure I-4 présente le cycle fonctionnel simplifié du remodelage osseux [De Vernejoul, 1993].

Ce processus se déroule en cinq étapes. Tout d'abord, le long de la surface osseuse inactive recouverte de cellules bordantes, ou ostéoblastes quiescents, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes. Cette phase d'activation est suivie de la phase de résorption lorsque les ostéoclastes résorbent l'os ancien. Lorsque les ostéoclastes ont terminé leur travail de résorption et creusé une lacune, ils sont remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique et/ou des précurseurs ostéoblastiques ; c'est la phase d'inversion qui précède la phase de reconstruction ou ostéoformation ; les ostéoblastes surviennent alors dans la lacune et la comblent en apposant une nouvelle matrice osseuse.

Certains ostéoblastes s'enfouissent dans la matrice qu'ils ont synthétisée et deviennent alors des ostéocytes.

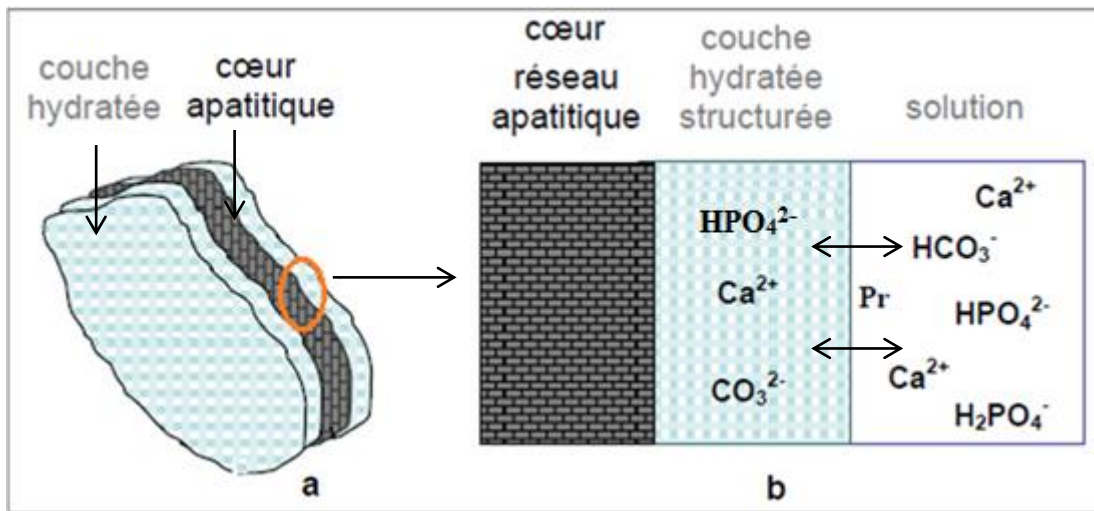


Figure I-3 : Représentation schématique de la couche hydratée en surface du domaine apatitique : a) vue du nanocristal (3D) et b) coupe du cristal montrant les différents domaines (structure apatitique, couche hydratée) et les échanges possibles avec les ions ou les protéines (Pr) du milieu aqueux environnant [Tadier, 2009].

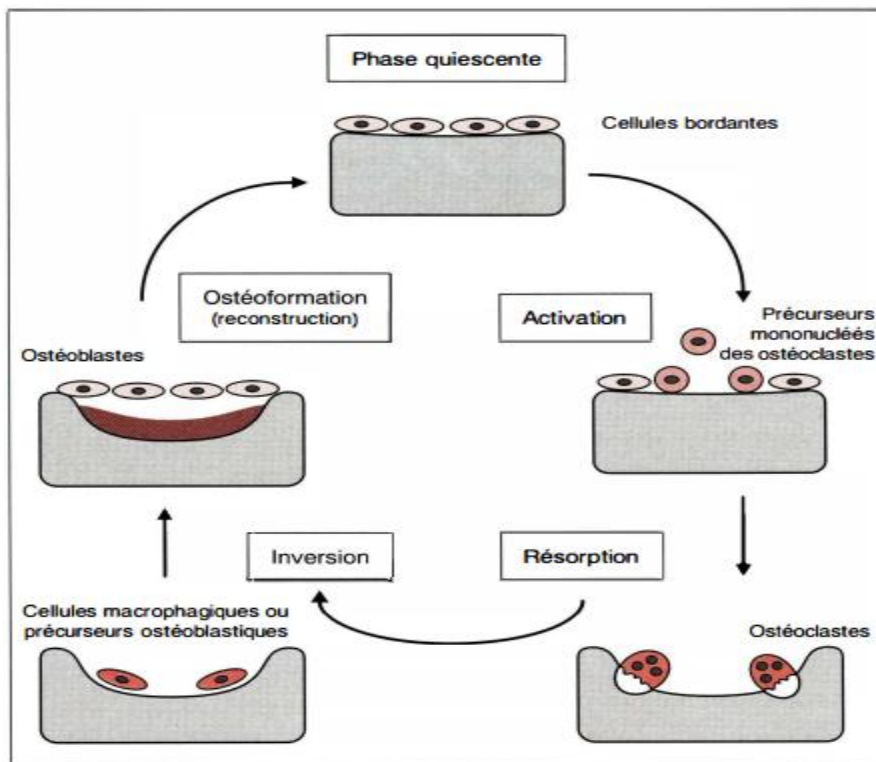


Figure III-4 : Représentation schématique des différentes phases du cycle de remodelage osseux [De Vernejoul, 1993].

I-3- Réparation osseuse : l'auto-cicatrisation

Suite à une perte de tissu osseux, et à condition que le défaut soit de petite taille, l'os a une capacité d'auto-cicatrisation. Une cascade d'événements collaborent permettant la cicatrisation de l'os (Figure I-5). Dans un premier temps, les cellules sanguines (hématies et plaquettes) et des protéines forment un réseau de fibrine. Dans un second temps, des cellules sont recrutées pour initier la formation d'un tissu de transition appelé tissu de granulation (Figure I-5-c). Dans une troisième étape le tissu de granulation est remplacé par du tissu cartilagineux qui comble le foyer de fracture formant le cal provisoire cartilagineux (Figure I-5-d). Ce dernier à son tour se calcifie et ses cellules meurent (Figure I-5-e). Le cal osseux (minéralisé) est ensuite remodelé (« sculpté ») par les ostéoclastes pour restaurer la forme originale de l'os (Figure I-5-f). Après un processus de guérison complet, les propriétés mécaniques et biologiques de l'os sont entièrement restaurées.

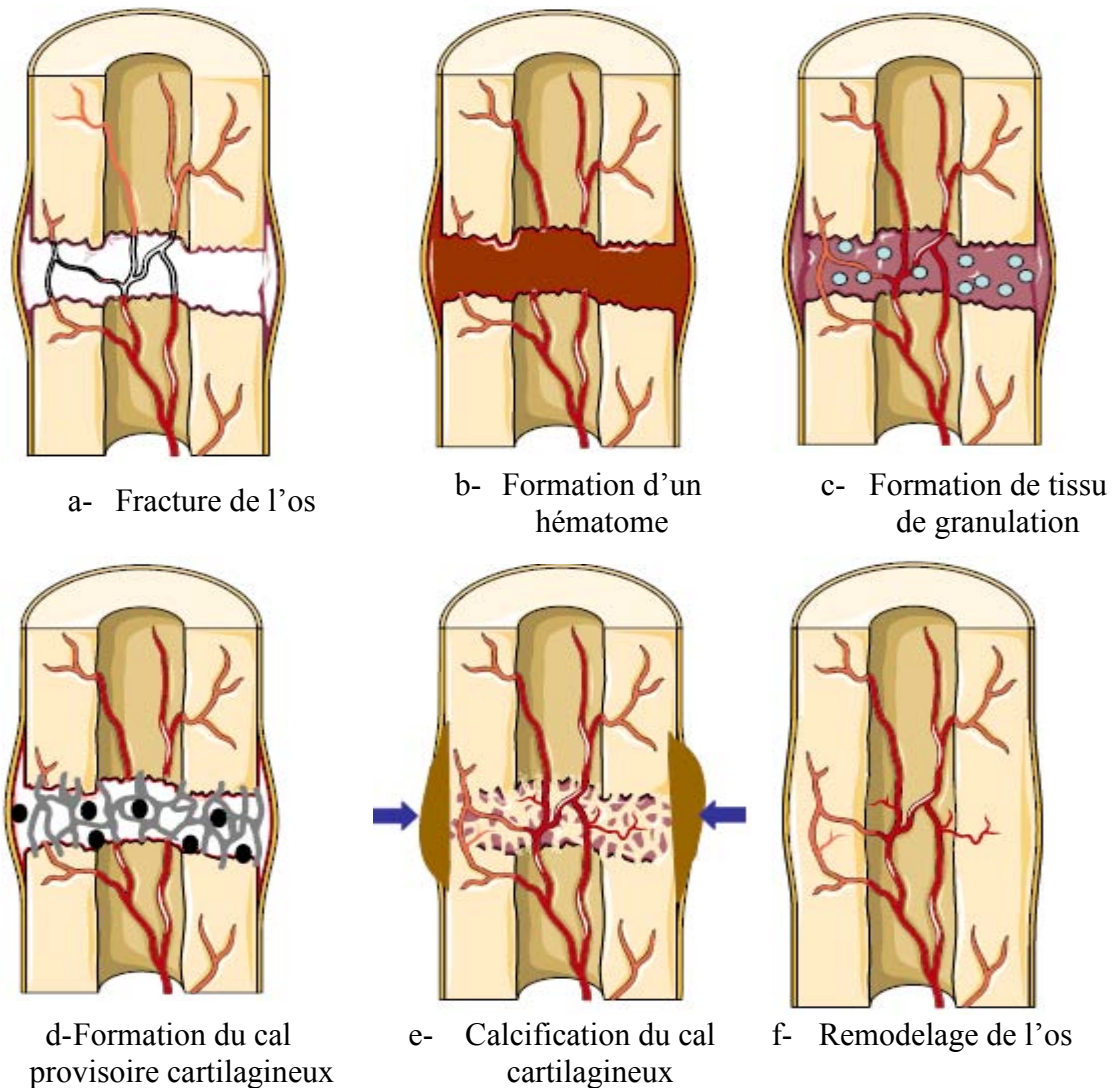


Figure I-5 : Etapes principales de la cicatrisation osseuse.³

³ <http://pdfmanual4.com/tissu-osseux-i-cellules-et-matrice-extracellulaire/>

L'os est en perpétuel remodelage (10 % du minéral renouvelé par an chez l'adulte) et possède d'importantes capacités d'autoréparation, grâce à une importante activité métabolique des cellules osseuses. Cependant, ces processus biologiques peuvent s'avérer trop longs ou ne pas être suffisants, notamment dans le cas de perte de substance importante en taille, dépassant les capacités de remodelage osseux « naturel ». C'est le cas des pertes de substance osseuse post-traumatiques, de pseudarthrose ou de défauts cavitaires après curetage pour tumeurs bénignes par exemple. Afin de remédier à ce problème, il est nécessaire de faire intervenir un matériau de comblement osseux pour permettre une régénération plus rapide des pertes osseuses. Nous nous proposons dans la seconde partie de ce chapitre de présenter les différents matériaux proposés comme substituts osseux.

II- BIOMATERIAUX DE SUBSTITUTION OSSEUSE

L'utilisation de matériaux de substitution osseuse ne cesse de se développer en chirurgie orthopédique, cranio-maxillo-faciale et reconstructrice ainsi qu'en odontologie. Les pertes de substance osseuse étendue, qu'elles soient congénitales, ostéolytiques, infectieuses ou néoplasiques, restent un défi majeur en termes de reconstruction. Les données de 2005 indiquent que plus de 2 millions de procédures d'implantations osseuses sont réalisées dans le monde chaque année [Iafisco et Delgado-Lopez 2014] et que le coût estimatif de ces procédures est d'environ 2,5 milliards de dollars US (\$ US). En France, on dénombre quarante à soixante-cinq mille fractures vertébrales par an, provenant d'accidents ou de pathologies telles que l'ostéoporose; celles-ci sont invalidantes et induisent un coût économique important [Orcel, 2009]. Il est donc nécessaire de trouver un traitement approprié qui puisse soulager la douleur et rétablir la fonction de soutien de la colonne vertébrale.

Plusieurs types de matériaux peuvent être utilisés pour le comblement osseux ; ceux-ci sont d'origine naturelle ou synthétique.

II-1- Substituts osseux d'origine naturelle

Les substituts osseux d'origine naturelle sont historiquement les premiers à avoir été développés. On compte parmi eux : l'autogreffe appelée également greffe autologue, l'allogreffe et la xéno greffe.

- l'autogreffe où l'os est prélevé sur le patient lui-même, sur un autre site,
- l'allogreffe où l'os est prélevé sur un autre individu de la même espèce,
- l'hétéro greffe ou xéno greffe où l'os provient d'une autre espèce.

La greffe osseuse autologue est considérée actuellement comme le « gold standard » en matière de restauration osseuse. Elle permet, en prélevant sur le patient, de corriger n'importe quelle perte de substance osseuse. Elle possède l'ensemble des caractéristiques nécessaires à la croissance osseuse : ostéoconduction, ostéogénèse, ostéoinduction, compatibilité immunitaire. Mais la quantité d'os disponible peut être limitée, de plus, l'accès à l'autogreffe nécessite souvent un deuxième abord chirurgical (ou incision) avec sa propre morbidité suite à diverses complications (inflammation, infection, douleurs) [Ross et al., 2000; Seiler et Johnson, 2000]. Les allogreffes, prélevées sur donneurs ou cadavres, sont une alternative intéressante aux autogreffes [Graham et Stockley, 2004; Dennis et Little, 2005]. Malgré des préparations élaborées, le risque de transmission de maladies du donneur ne peut être complètement évité. La xéno greffe concerne le cas où le tissu osseux provient d'un individu d'une espèce différente, principalement le bœuf et le porc. Cependant, le risque théorique de transmission d'agents infectieux spécifiques aux espèces bovines ou porcines a considérablement limité son développement [Melo et al., 2001]. Les limites des autogreffes, allogreffes et xéno greffes ont motivé la recherche d'alternatives. Les chercheurs ont

développé divers biomatériaux synthétiques à base de polymères, de céramiques ou des composites dont un grand nombre sont commercialisés.

II-2- Substituts osseux synthétiques

Les recherches sur les matériaux synthétiques ont connu un développement considérable au cours des quatre dernières décennies ; cette stratégie permet d'obtenir des substituts de manière reproductible, en quantité quasiment illimitée, sans risque de transmissions, et avec un coût contrôlé. En outre, il est possible de choisir la forme (blocs denses, granules poreux, poudres, gels, ciments) et le type de matériaux constitutifs (métaux, alliages, polymères, céramiques). Ainsi plusieurs familles de biomatériaux ont été élaborés : métaux et alliages métalliques, céramiques inertes ou bioactives, polymères et composites [Iafisco et Delgado-Lopez, 2014].

II-2-1- Céramiques

Parmi les céramiques utilisées dans le domaine des biomatériaux de reconstruction osseuse, on distingue les céramiques inertes, principalement l'alumine et la zircone utilisées dans les têtes de prothèses totales de hanche, ainsi qu'en odontologie pour les implants dentaires des céramiques bioactives notamment celles à base de phosphates de calcium pour leurs applications notamment en comblement osseux.

II-2-1- 1- Céramiques phosphocalciques

Les céramiques phosphocalciques sont des biomatériaux de synthèse utilisés en dentisterie depuis les années 1970, puis en orthopédie depuis les années 1980 [Bohner, 2000 ; Hak, 2007]. Elles sont fabriquées par frittage à haute température (environ 1200°C), d'où le nom de céramiques. Ces biocéramiques présentent une composition proche du minéral osseux, ce qui leur donne l'avantage d'être ostéoconductrices, biocompatibles et partiellement résorbables. Elles ont été largement utilisées pour le comblement de pertes de substance osseuse de toute origine [Yamamoto et al., 2002; Oonishi et al., 1997].

Parmi les différents phosphates de calcium, les biocéramiques les plus étudiées et utilisées sont celles à base d'hydroxyapatite (HA) et/ou de phosphate tricalcique β (β -TCP). L'utilisation de céramiques biphasiques, mélange d'HA et β -TCP à des proportions variables, permet de contrôler la bioactivité du substitut (le β -TCP est plus soluble que l'HA dans les conditions physiologiques vis-à-vis du tissu osseux) [Delecrin et al., 2000; Ransford et al., 1998].

II-2-1- 1-1- Hydroxyapatite

Depuis longtemps l'hydroxyapatite constitue un modèle de choix et est considéré comme un prototype du minéral des tissus calcifiés.

L'hydroxyapatite est une céramique phosphocalcique de synthèse dont les blocs sont obtenus par pressage et frittage de la poudre initiale. Elle est caractérisée par sa composition chimique similaire à la matrice minérale de l'os, d'où ses propriétés ostéoconductrices et son excellente biocompatibilité [Ghosh et al., 2008 ; Nandi et al., 2008]. Sa formule chimique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ avec un rapport atomique calcium/phosphore égal à 1,67. Sachant que la résorbabilité des céramiques dépend d'une part de leur surface spécifique et d'autre part de la solubilité des phases qui les constituent, les céramiques d'HA sont considérées comme peu résorbables (le produit de solubilité de l'HA stœchiométrique étant très faible).

La poudre d'HA a également été utilisée comme revêtement pour les implants métalliques dans le but de faciliter leur fixation et intégration à l'os receveur [Regner et al., 1998, Tonino et al., 1999; Sanden et al., 2002]. Elle est reconnue aussi comme étant un excellent support de facteurs de croissance et de cellules ostéogéniques. Elle peut également servir de support pour la libération d'agents bioactifs [Noshi et al., 2000 ; Lepretre et al., 2009].

II-2-1- 1-2- Phosphate tricalcique

Le phosphate tricalcique (TCP) est biorésorbable et biocompatible. Sa cristallinité et sa composition chimique sont proches de la phase minérale de l'os. Sa formule chimique est $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ avec un rapport atomique calcium/phosphore égal à 1,50. Il existe sous deux formes cristallines : α ou β (α -TCP ou β -TCP). La biodégradation du TCP est plus rapide que celle de l'HA, par dissolution et par résorption ostéoclastique ce qui contribue à une bonne ostéoconductivité, avec une résorption concomitante au remodelage de l'os [Daculsi et al., 1990 ; Nandi et al., 2008]. Depuis plus de 20 ans les implants en TCP sont utilisés pour le comblement osseux en chirurgie orthopédique et dentaire [Shigaku et al., 2005].

II-2-1- 1-3- Biocéramiques phosphocalciques biphasiques

Les céramiques phosphocalciques biphasiques (BCP : biphasic calcium phosphate) sont les biocéramiques les plus répandues; elles allient les propriétés de l'hydroxyapatite et celles du phosphate tricalcique β . Grâce à l'ostéoconduction et la dissolution, les BCP permettent au tissu osseux de progresser des berges du défaut vers l'intérieur de l'implant [Pratt et al., 2002 ; Daculsi et al., 1989]. Les propriétés, en particulier la bioactivité des BCP, peuvent être contrôlées en faisant varier la proportion en HA et en β -TCP. Cependant les bio-fonctionnalités initiales demeurent incomplètes comme des propriétés mécaniques faibles et une colonisation osseuse en profondeur réduite.

II-2-2- Ciments en tant que biomatériaux de comblement osseux

Le principal avantage des ciments biomédicaux par rapport aux biocéramiques est qu'ils offrent la possibilité d'épouser la forme du défaut à combler du fait de leur implantation sous forme de pâte malléable voire injectable. On distingue deux grandes familles de ciments biomédicaux : les ciments acryliques et les ciments minéraux dont les ciments phosphocalciques.

II-2-2- 1- Ciments acryliques

Les ciments à base de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) sont utilisés en dentisterie depuis les années 1940 et depuis les années 1960 en orthopédie notamment pour le scellement et les reprises de prothèses [Charnley 1964]. Ce produit est le résultat d'une réaction de polymérisation entre une phase solide constituée d'homopolymère de méthyl méthacrylate (MMA) et le peroxyde de benzoyle comme initiateur de la réaction de polymérisation et une phase liquide constituée de la forme monomérique de MMA.

Ce matériau est considéré comme bio-inerte et montre une bonne biocompatibilité sur le long terme. Depuis le milieu des années 1980, ces ciments sont utilisés pour le traitement de fractures pathologiques des corps vertébraux. Le matériau est très utilisé du fait qu'il présente les avantages d'être bien identifié, d'être facile d'utilisation, de posséder d'excellentes propriétés mécaniques (résistance en compression proche de celle de l'os trabéculaire, 80 MPa) et peuvent être préparés sous forme injectable. Cependant, sa bio-inertie ne permet pas une bonne intégration au tissu osseux environnant, sa dureté provoque des fractures des vertèbres adjacentes dues à une mauvaise répartition des charges, sa température de prise élevée entraîne des nécroses et les éventuels monomères résiduels sont associés à des risques de cytotoxicité et d'embolies [Lieberman et al., 2005 ; Kallmes et al., 2003].

II-2-2- 2- Ciments phosphocalciques

Les ciments à base de phosphates de calcium (CPC) ont été découverts dans les années 1980 par Brown et Chow [Brown et al., 1982] ainsi que LeGeros et al. [LeGeros et al., 1982]. Ce sont des ciments hydrauliques, obtenus par une réaction acide base entre deux phosphates de calcium, l'un acide et l'autre plus basique, dans l'eau ou une solution aqueuse. Après mélange il en résulte un phosphate de calcium de basicité intermédiaire, moins soluble qui va précipiter. Cette réaction de prise est généralement isothermique [Passuti et al., 2003] éliminant le risque de nécrose osseuse rencontrée avec les ciments PMMA.

Ces dernières années diverses formulations des ciments minéraux ont été développées, notamment des ciments biphasiques incluant en plus de phosphates de calcium par exemple une phase de carbonate ou de sulfate de calcium pour améliorer la résorption des ciments apatitiques [Fontaine et al., 2001; Combes et al., 2006b] ou encore de phosphate de magnésium pour le rôle de Mg^{2+} dans le métabolisme osseux [Mestres et al., 2011]; la plupart

des ciments actuellement développés contiennent un ou plusieurs phosphates de calcium dans leur phase solide (mélange de poudres réactives). L'avantage des ciments phosphocalciques est notamment dû à leurs propriétés biologiques (biocompatibilité et bioactivité) [Ginebra et al., 2012], à leur capacité à s'adapter à la forme du défaut osseux à combler, et à leur facilité de mise en œuvre et d'implantation. Ces ciments peuvent être injectables sous forme d'une pâte visqueuse durant l'intervention capable de durcir *in-situ* grâce à une réaction de prise à la température corporelle. Pour les praticiens, cette forme de biomatériaux permet de développer des techniques chirurgicales peu invasives, ce qui présente des avantages significatifs dans plusieurs situations cliniques.

Cette famille de biomatériaux a été utilisée avec succès dans le comblement des pertes de substance osseuse. Les premiers produits commerciaux CPCs ont été introduits dans les années 1990 pour le traitement des défauts maxillo-faciaux [Friedman et al., 1998], ainsi que pour le traitement des fractures [Constantz et al., 1995]. Leur biocompatibilité et leur résorbabilité ont été prouvées chez l'animal [Apelt et al., 2004; Theiss et al., 2005] et confirmées chez l'homme.

Notre travail de thèse s'intéressera à un ciment à base de phosphate et de carbonate de calcium, mis au point au CIRIMAT [Fontaine, 2001]. Il est préparé à partir d'un phosphate de calcium et d'une proportion importante de carbonate de calcium (50 % en masse). L'intérêt d'une telle composition faisant intervenir une proportion importante de carbonate de calcium métastable en milieu physiologique, est d'améliorer la résorption du matériau et donc de favoriser la reconstruction osseuse [Combes et al., 2006].

III- INFECTIONS OSSEUSES ET TRAITEMENT

III-1- INFECTIONS OSSEUSE

L'infection osseuse est définie comme la colonisation du tissu osseux par un microorganisme, le plus souvent un type de bactéries, associée à une inflammation et une destruction osseuse [Wright et Nair, 2009]. Les infections ostéo-articulaires regroupent un nombre important d'infections qui se distinguent par leur site (articulation, rachis, os longs...), leur évolution (aiguë, chronique), la présence ou non de matériel étranger (prothèse articulaire, matériel d'ostéosynthèse), le(s) micro-organisme(s) en cause, et la voie de contamination (hématogène, post-opératoire, de contiguïté...) [Zayane, 2010].

L'infection osseuse survient après un traumatisme, généralement une fracture ouverte avec ou sans perte de substance osseuse. Elle peut également se manifester après la mise en place de matériels d'ostéosynthèse pour réparer une fracture. Dans le cas d'une infection sur prothèse (souvent de hanche ou genou) la contamination peut subvenir en per- ou post-opératoire. Le germe le plus rencontré dans les infections osseuses est le staphylocoque doré [Zayane, 2010], appelé également *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Il contamine l'os par la voie sanguine, à partir d'une infection locale ou post-opératoire. Il existe également d'autres

germes que le *Staphylococcus aureus*, par exemple le *Staphylococcus epidermidis* ; celui-ci est responsable des infections sur prothèse [Campoccia et al., 2006] et a une capacité particulière à adhérer à la surface des implants, en particulier celle des polymères (telle que le PMMA), et à les coloniser. D'autres souches bactériennes de type *Staphylococcus* sont exceptionnellement rencontrées dans les infections osseuses, notamment le *Staphylococcus hominis* et le *Staphylococcus haemolyticus* [Campoccia et al., 2006].

Certaines souches sont devenues très problématiques ; parmi celles-ci on distingue le *Staphylococcus aureus* devenu résistant à la méthicilline (SARM⁴). La méthicilline est un antibiotique du sous-groupe Pénicilline M, du groupe des Pénicillines, de la famille des β -lactamines. Les SARM peuvent présenter des résistances croisées aux autres antibiotiques de la famille des β -lactamines, du groupe des pénicillines (Pénicilline G, Pénicilline A : Amoxicilline) ou du groupe des céphalosporines. Les infections en SARM sont graves et peuvent être communautaires ou hospitalières [Dombrowski et Winston, 2008 ; Rice et Mendez-Vigo, 2009]. D'autres bactéries peuvent être à l'origine des inflammations du tissu osseux (ostéites⁵), telles que des bactéries à Gram positif comme les Streptocoques, ou à Gram négatif comme *Escherichia coli* (communément appelée *E. coli*), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*, ou encore des germes anaérobies tels que les corynebactéries et *Clostridium* [Campoccia et al., 2006].

III-2- TRAITEMENT DE L'INFECTION OSSEUSE

Le traitement de l'infection osseuse repose sur l'administration d'antibiotiques adaptés au germe retrouvé dans le site à traiter. Le traitement se fait par voie systémique (en général par voie injectable avec relais par voie orale, dite aussi « per os »). Dans les cas où un traitement curatif local est décidé, une intervention chirurgicale est réalisée. Elle permet à la fois l'ablation du corps étranger (prothèse, matériel d'ostéosynthèse : plaque, vis...) ou de séquestres osseux et l'implantation du biomatériau vecteur d'antibiotique (classiquement le PMMA chargé de gentamicine sous forme de billes ou de ciment). Dans le cas où les germes sont résistants aux antibiotiques, une ré-intervention dans un second temps est nécessaire pour nettoyer le foyer infectieux [Zayane, 2010].

Différents antibiotiques sont utilisés pour traiter les infections osseuses [Zayane, 2010] : c'est le cas des pénicillines M (Oxacilline, Floxacilline), des aminosides avec la gentamicine, de la tobramycine et la kanamycine, des fluoroquinolones telle que l'ofloxacine. La riampicine, associée à d'autres antibiotiques, est également utilisée avec une grande efficacité. Les polypeptides vancomycine et teicoplanine sont utilisés en cas de suspicion de présence de

⁴ SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

⁵ L'**ostéite** est une inflammation du tissu osseux, causée le plus souvent par une infection bactérienne ; elle peut être aiguë ou chronique.

staphylococcus aureus résistants à la méthicilline (SARM). Les antibiotiques sont choisis en fonction du germe isolé et de l'antibiogramme.

III-2-1- Traitement par voie systémique

Classiquement, le traitement des infections osseuses chroniques repose sur l'antibiothérapie par voie générale (injectable ou per os). Cette antibiothérapie est souvent de durée prolongée dans les infections récalcitrantes. Ceci a pour conséquence l'apparition d'effets secondaires des antibiotiques (allergies, intolérances digestives...) et aboutit – ajouté à la contrainte des prises répétées de ces médicaments - à l'arrêt de ces traitements par le patient.

La mauvaise vascularisation des tissus scléreux de l'ostéite chronique nécessite, pour être contournée, la prescription de doses élevées, ce qui contribue à l'apparition des effets secondaires et à la non observance du traitement. C'est pour toutes ces raisons que le recours à l'antibiothérapie locale dans le traitement des infections osseuses chroniques devient une nécessité [Zayane, 2010].

III-2-2- Antibiothérapie locale

L'utilisation de l'antibiothérapie locale pour traiter les infections osseuses a connu plusieurs phases évolutives [Zayane, 2010]. Les antibiotiques étaient d'abord mélangés avec des antiseptiques dans le liquide d'irrigation-lavage [Oguachuba, 1983] ou délivrés par l'intermédiaire de pompes implantables [Perry et al., 1988]. Cependant, la forme d'utilisation qui a le plus résisté à l'épreuve du temps est l'utilisation des antibiotiques associés à des biomatériaux permettant une délivrance locale de l'antibiotique ; le système le plus connu et le plus largement développé est le ciment acrylique PMMA-gentamicine (ou tobramycine), utilisé depuis les années 1970 [Buchholz et al., 1970]. Les biomatériaux résorbables, permettant la libération locale d'antibiotiques, ont été beaucoup développés en expérimentation animale et différents biomatériaux incluant un antibiotique ont été utilisés chez l'animal et chez l'homme [Zayane, 2010], inaugurant le nouveau concept thérapeutique de système de délivrance de médicament (Drug Delivery System - DDS).

Ce mode d'antibiothérapie offre des avantages significatifs dans le traitement et la prévention des infections orthopédiques [Zayane, 2010 ; Diefenbeck et al., 2006 ; Kanellakopoulou et al., 2000]. Il permet tout à la fois de pallier l'insuffisance de l'apport vasculaire et de délivrer l'antibiotique *in situ* en réduisant de façon très importante les doses de principes actifs circulant dans l'organisme et en limitant de ce fait la manifestation d'effets secondaires [Le Huec et al., 1997 ; Korkusuz et al., 1993 ; Shinto et al., 1992]. Par comparaison avec un traitement oral, le traitement localisé entraîne une réduction d'un facteur 1000 de la dose administrée dans le cas d'infections parodontales. De plus, la concentration au niveau de la zone à traiter est multipliée par 100 [Goodson et al., 1985].

III-2-2-1- Ciments acryliques pour la délivrance locale d'antibiotique

Le ciment osseux à base de polyméthacrylate de méthyle est étudié et utilisé pour la libération locale d'antibiotique en chirurgie orthopédique. Il est utilisé *in vivo* chez l'homme dans la prévention et le traitement des infections osseuses [Buchholz et al., 1984; McNally et al., 1993 ; Ostermann et al., 1995]. Malgré ses avantages, et après quatre décennies d'utilisation, le ciment PMMA en tant que système de délivrance d'antibiotique a révélé des inconvénients. Les études de la libération *in vitro* de gentamicine à partir du PMMA ont montré, dès les premiers travaux sur le sujet, un relargage limité de la quantité d'antibiotique mise initialement dans le PMMA [Hoff et al., 1981 ; Van de Belt et al., 2000]. L'association d'un ciment acrylique avec d'autres antibiotiques, par exemple avec la tobramycine ou la vancomycine [Penner et al., 1996], ont conduit aux mêmes observations. Cette rétention de l'antibiotique est principalement due à la faible porosité de ce type de ciment et à ses caractéristiques de surface [Baker et Greenham, 1988; Masri et al., 1995]. La forme compacte du ciment ne facilite pas la libération de grandes quantités d'antibiotique. Ces inconvénients ont fini par limiter l'utilisation du PMMA comme système de délivrance d'antibiotique. La recherche d'alternative, en particulier dans l'indication du traitement curatif local de l'infection osseuse, s'est orientée vers les biomatériaux résorbables.

III-2-2-2- Phosphates de calcium pour la délivrance locale d'antibiotiques

L'utilisation des phosphates de calcium comme support de libération d'un antibiotique est apparue particulièrement intéressante à plusieurs titres. Obtenues à haute température, les biocéramiques possèdent une macroporosité importante tout en préservant des propriétés mécaniques intéressantes. Leur surface spécifique, intrinsèquement faible et leur faible réactivité ne leur permet néanmoins pas d'interagir avec les espèces ioniques environnantes.

De nombreuses études ont montré que les céramiques phosphocalciques (HA et β TCP) peuvent être utilisées [Iafisco & Delgado-Lopez, 2014 ; Aoki, 1994] pour délivrer des composés de natures diverses (protéines, antibiotiques, anticoagulants, anticancéreux, antiostéoporotiques...). Dans la plupart des cas, le principe actif est incorporé sous forme solide dans la céramique [Barroug et al., 2002 ; Uchida et al., 1992]. Dans ces conditions, les facteurs qui gouvernent leur processus de fixation et de libération vis-à-vis du milieu environnant restent mal connus. Il est bien établi que les caractéristiques physicochimiques du support ainsi que le procédé d'élaboration jouent un rôle déterminant dans leur processus de fixation et de libération [Errassifi et al., 2014] ; ces informations s'avèrent particulièrement critiques pour le développement de systèmes à base de phosphates de calcium pour la libération d'actifs *in vivo*.

L'introduction de principes actifs peut alors être réalisée par simple imprégnation, et leur libération s'effectuera par des phénomènes de dissolution/diffusion au travers du réseau poreux de la céramique. La maîtrise de la porosité sera un paramètre déterminant dans le

contrôle de la cinétique de libération. Lorsqu'ils sont obtenus à basse température, ces phosphates de calcium peuvent avoir une surface spécifique très importante et une réactivité de surface qui favorisent l'adsorption des principes actifs. La libération s'effectuera alors, en partie, par une réaction d'échange ionique avec les espèces environnantes. De plus, les nombreuses possibilités de mise en forme (micro- ou nanoparticules, blocs poreux ou denses, pâtes de ciment, revêtements) permettent de répondre à différentes indications pour le comblement et/ou la régénération osseuse. Là encore, la maîtrise de la cinétique de libération pourra alors s'effectuer par une maîtrise de l'architecture du matériau (porosité, tortuosité).

III-2-2-2-1- Association de l'antibiotique avec une biocéramique

L'élaboration des céramiques par frittage à haute température empêche leur mélange avec des antibiotiques au moment de l'élaboration, ce qui constitue un obstacle majeur à l'utilisation des céramiques pour la délivrance d'antibiotique. Afin de contourner cet obstacle d'autres procédés ont été utilisés. La technique d'adsorption sous pression, après la phase du frittage, a été utilisée pour associer l'antibiotique (sulfate d'isepamicine, vancomycine ou flomoxef) à l'hydroxyapatite [Hasegawa et al., 2004] ; la totalité de l'antibiotique a été relarguée au bout de 24 heures. D'autres méthodes ont été utilisées afin d'allonger la durée du relargage de l'antibiotique ; celui-ci a été intégré au cœur du biomatériau à l'aide d'un procédé de centrifugation, ce qui a permis d'atteindre une durée de relargage prolongé sur 18 jours [Itokazu et al., 1995]. L'utilisation d'une biocéramique à base d'hydroxyapatite de forme cubique, de porosité entre 50 et 150 μm , dans laquelle était creusé un défaut cylindrique pour recevoir l'antibiotique a permis de traiter avec succès 18 patients atteints d'ostéomyélite chronique [Yamashita et al., 1998].

Plusieurs travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont été effectués avec une céramique à base de phosphate tricalcique β (β -TCP) chargé en antibiotiques. L'étude menée *in vitro* sur des billes de β -TCP chargées avec de la gentamicine ou de la vancomycine a montré que des taux de 67 % de vancomycine et de 93 % de gentamicine ont été élués au bout de quatre heures, et que la totalité de l'antibiotique a été élue au bout de 20 heures [Brouard et al., 1997]. Afin de prolonger la durée de relargage de la vancomycine, des billes compactes de β -TCP avec une porosité de 20 % et 40 % ont été utilisées [Thomazeau et al., 1996] ; ceci a permis de prolonger la libération de la vancomycine pendant 21 jours avec des doses égales à 1,5 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI)⁶ ; cependant, la durée n'a pas dépassé 32 heures pour la gentamicine.

D'autres études réalisées *in vivo* sur des sphérules de β -TCP chargées en gentamicine et vancomycine par immersion dans une solution de ces antibiotiques et testés sur des lapins ont montré que la totalité de l'antibiotique a été libérée en moins de deux jours [Lambotte et al.,

⁶ Concentration minimale inhibitrice (CMI) : c'est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible d'un organisme après 24 h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique. C'est la caractéristique la plus utilisée pour évaluer *in vitro* l'activité bactériostatique d'un antibiotique.

1998]. Les tests d'élution du β -TCP chargé de teicoplanine au contact de sites infectés par le *Staphylococcus aureus* chez des lapins montrent un relargage dégressif de l'antibiotique au fil du temps. Les doses libérées restent supérieures à la CMI de teicoplanine vis-à-vis du *S. aureus* [Murase et al., 2003].

Malgré leur biocompatibilité et leurs excellentes propriétés ostéoconductrices, le mode d'association optimal de l'antibiotique avec les céramiques phosphocalciques reste à trouver afin d'éviter le relargage rapide de l'antibiotique.

III-2-2-2-2- Ciments phosphocalciques pour la délivrance locale d'antibiotique

La possibilité d'élaborer les ciments phosphocalciques (CPCs) à température ambiante ou corporelle, ainsi que leur porosité intrinsèque permet d'incorporer des médicaments, des molécules biologiquement actives, voire des cellules, sans dénaturation thermique ou une perte d'activité lors de la préparation ou après implantation. Cela offre la possibilité d'utiliser les CPCs non seulement comme des substituts osseux ostéoconducteurs, mais aussi comme des systèmes à libération locale contrôlée de médicaments.

L'utilisation des ciments phosphocalciques en tant que systèmes à libération de principes actifs a été largement étudiée. Une revue exhaustive récente des différentes approches de l'application des CPCs pour la libération de médicaments est présentée par Ginebra et al. (2012).

L'étude réalisée *in vitro* sur l'élution de la gentamicine à partir de ciments hydrauliques phosphocalciques [Bohner et al., 1997] a montré que la totalité de l'antibiotique a été libérée après 60 heures. L'observation d'élution rapide à partir de divers ciments phosphocalciques a également été notée pour la vancomycine [Hofmann et al., 2009 ; Liu et al., 2009] , la ciprofloxacine [Hofmann et al., 2009] et la doxycycline [Tamimi et al., 2008 ; Alkhraisat et al., 2010].

Différentes études *in vivo* ont évalué les propriétés antibactériennes des CPCs chargés en antibiotiques. L'implantation d'un ciment phosphocalcique associé à la teicoplanine s'est révélée prometteuse suite à son efficacité pour le traitement de souches résistantes à la méthicilline [Lazarettos et al. 2004]. Joosten et al ont analysé l'efficacité d'un CPC apatitique chargé de gentamicine sur des lapins avec ostéomyélite : ils ont montré qu'après seulement trois semaines de traitement l'infection a disparu [Joosten et al., 2004]. Une étude comparative sur des lapins avec ostéomyélite a montré que les lapins traités par un CPC chargé avec la gentamicine ne présentent aucune infection, tandis que dans le groupe de lapins traités par voie systémique avec la gentamicine, l'infection est toujours présente [Stallmann et al., 2004].

III-3- Acide fusidique dans le traitement de l'infection osseuse

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des patients au cours des dernières années a nécessité une recherche d'alternatives. Une approche prometteuse repose sur la réévaluation des anciens antibiotiques. En raison de leur utilisation limitée, de nombreux antibiotiques tels que l'acide fusidique sont restés actifs contre un grand nombre d'isolats bactériens qui sévissent actuellement, et apparaissent comme des alternatives intéressantes pour les infections difficiles à traiter [Falagas, 2008].

L'apparition du staphylocoque doré résistant à la méthicilline (SARM) comme agent pathogène dans les infections orthopédiques a conduit les cliniciens et les microbiologistes à rechercher de nouveaux antibiotiques ou de nouvelles combinaisons d'antibiotiques qui soient efficaces mais également compatibles avec des traitements prolongés [Gould 2007 ; Garvin et al., 1999]. L'acide fusidique a été découvert dans les années 1960, mais comme beaucoup d'anciens antibiotiques, il n'a jamais été intensivement étudié ou largement appliqué à des infections orthopédiques malgré son activité contre le staphylocoque et les autres infections à gram-positif [Atkins et al., 1999 ; Whitby, 1999].

Dans le cadre de cette étude nous nous intéresserons plus particulièrement à l'acide fusidique et son sel soluble, le fusidate de sodium. Cet antibiotique présente des propriétés bactéricides et fongicides à spectre large et une excellente pénétration osseuse [Migaud et al., 2008]. Outre son activité thérapeutique, cet antibiotique possède l'avantage de se présenter sous deux formes solides qui présentent des solubilités différentes.

III-3-1- Propriétés de l'acide fusidique

L'acide fusidique est un triterpénoïde tétracyclique, dérivé à partir du bouillon de fermentation du champignon *Fusidium coccineum* [Godtfredsen et al., 1962]. L'acide fusidique (FA) et son sel, le fusidate de sodium (SF) sont commercialisés sous le nom Fucidin®. Leurs structures chimiques sont représentées sur la figure I-6. L'acide fusidique se trouve sous forme de poudre cristalline blanche d'un poids moléculaire de 516,7 g/mol (FA anhydre). C'est un acide faible ayant un pK_a de 5,35, qui est principalement ionisé dans le plasma et à pH physiologique. L'acide fusidique est presque insoluble dans l'eau [Mandell et al., 2000], tandis que le fusidate de sodium est facilement soluble dans l'eau [Coello et al., 1994]. En raison de sa similitude de structure avec les sels biliaires, l'acide fusidique forme des micelles à des concentrations dans la gamme de 1,44 à 4,56 mM [Carey et al., 1971]. Au-dessus de 11 mM, FA a également une tendance à l'auto-agrégation en solution aqueuse [Coello et al., 1994].

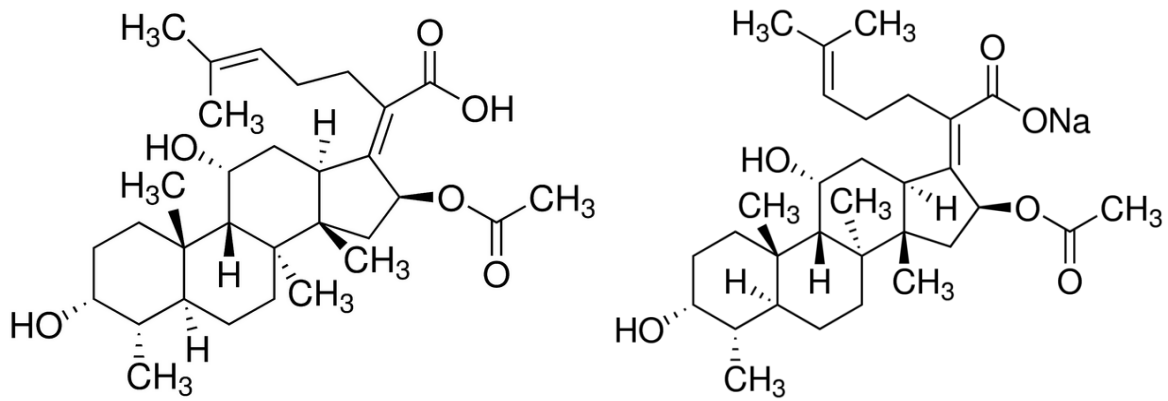


Figure I-6 : Structures chimiques de l'acide fusidique (FA, à gauche) et du fusidate de sodium (SF, à droite).

III-3-2- Pharmacologie

L'acide fusidique est un agent antimicrobien qui agit comme inhibiteur de la synthèse des protéines dans les micro-organismes [Tanaka et al., 1969]. Il interfère avec la translocation du facteur d'élongation G (EF-G) à partir du ribosome en stabilisant le complexe di-phosphate EF-G-ribosome-guanosine. Ceci empêche la liaison de l'aminoacyl-ARNt au ribosome et arrête ensuite le transfert des acides aminés supplémentaires au polypeptide de croissance [Bodley et al., 1970]. Il est principalement bactériostatique⁷, mais il peut devenir bactéricide⁸ à des concentrations plus élevées [Collignon et al., 1999]. L'acide fusidique est principalement actif contre les organismes gram-positifs, aérobies et anaérobies ; il est le plus actif contre les souches *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *S. epidermidis*, et les staphylocoques à coagulase négative, y compris des souches qui sont résistantes à la méthicilline (SARM) qui causent couramment des infections de prothèses articulaires [Darley et al., 2004 ; Turnidge 1999 ; Atkins et al., 1999 ; Whitby et al., 1999 ; Tunger et al., 2001].

L'activité de l'acide fusidique contre les infections dépend des concentrations du médicament atteignant les tissus. Les concentrations entre 0,03 et 0,12 mg/L inhibent pratiquement toutes les souches de staphylocoques [Mandell et al., 2000 ; Turnidge 1999 ; Collignon et al., 1999 ; Tunger et al., 2001] ; les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour le SARM sont un peu plus élevées (0,03 à 0,8 mg/L).

Les effets secondaires de l'acide fusidique comprennent l'hyperbilirubinémie, les thrombophlébites, le venospasme, et l'ictère réversible dans le cas où l'administration de l'acide fusidique se fait par voie intraveineuse [Mandell et al., 2000]. Pour l'administration par voie orale, des effets secondaires se manifestent, à savoir des douleurs épigastriques,

⁷ Les antibiotiques **bactériostatiques** inhibent la croissance et la reproduction des bactéries, mais ne les tuent pas, alors que les antibiotiques bactéricides tuent les bactéries.

⁸ Une substance **bactéricide** est une substance ayant la capacité de tuer des bactéries. Les propriétés bactéricides varient d'une substance à l'autre, en termes de spectres d'action, d'efficacité et de durée d'action.

l'anorexie, des vomissements et diarrhées, l'hyperbilirubinémie et la jaunisse réversible [Christiansen, 1999].

III-3-3- L'acide fusidique dans les ciments

Les ciments osseux à base de PMMA et de plâtre de Paris (POP) chargés avec de l'acide fusidique (FA) ou son sel le fusidate de sodium (SF) ont été utilisés pour la libération locale de l'antibiotique en chirurgie orthopédique. Des essais réalisés *in vitro* en combinant l'acide fusidique et la gentamicine incorporés dans un ciment PMMA se sont révélés plus efficaces contre les bactéries, comparés aux tests menés avec la gentamicine combinée à la clindamycine ou avec la gentamicine seule [Neut et al., 2006]. L'étude prospective pour évaluer l'utilisation prophylactique du ciment PMMA chargé en FA et gentamicine en chirurgie orthopédique a révélé que les patients ayant été traités avec un ciment chargé en antibiotique n'ont pas développé une infection chronique [Coombs et al., 1990]. L'utilisation du ciment PMMA chargé en fusidate de sodium chez le lapin pendant une période allant de 45 à 187 jours [Quinlan et al., 1978] a montré que le fusidate de sodium a été libéré mais à des concentrations relativement faibles (0,014 - 0,530 µg/mL).

Dans une étude d'ostéogénèse chez le lapin des billes de POP chargées en FA et en gentamicine n'ont pas montré d'effets négatifs sur le processus de néoformation du tissu osseux [Varlet et al., 1985], alors que les billes POP chargées en rifamycine ont légèrement réduit l'induction osseuse. D'autres part, l'implantation du même support chargé en FA et en amoxicilline [Bouillet et al., 1989] a révélé la cicatrisation osseuse au bout de 3 à 6 semaines chez 16 patients parmi un total de 19 patients; au cours de la même période (3-6 semaines), les billes de biomatériaux ont été résorbées.

L'élaboration de biomatériaux de comblement et/ou de substitution osseuse avec un traitement approprié qui puisse soulager la douleur et rétablir la fonction de soutien du squelette repose sur la maîtrise des propriétés de surface qui contrôlent les différents échanges avec le milieu vivant environnant. L'étude des phénomènes d'adsorption-libération aux interfaces entre biomatériaux apatitiques et molécules thérapeutiques, notamment les antibiotiques, permettrait de comprendre les processus impliqués dans les cinétiques de relargage et d'optimiser la formulation du biomatériau pour une libération contrôlée de principes actifs pour le traitement local des maladies osseuses. Dans cette perspective, l'étude d'interaction entre antibiotiques et matériaux phosphocalciques supports à la libération locale sera abordée dans la perspective d'élucider leur mode d'association.

IV- ADSORPTION A L'INTERFACE SOLIDE-LIQUIDE

IV-1- Enjeu de l'étude des processus d'adsorption

Les propriétés de surface aux interfaces entre les phosphates de calcium apatitiques et le milieu environnant interviennent dans différents domaines (biologie, géologie, minéralogie,

procédés industriels,...). Dans le domaine médical, les processus d'adsorption et de désorption de ces matériaux vis-à-vis de protéines et de médicaments jouent un rôle déterminant dans la formation et l'évolution des tissus minéralisés ainsi que celles des biomatériaux de substitution avant et après implantation. Il est bien admis que plusieurs biomacromolécules (protéines osseuses spécifiques tels que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, ainsi que des protéines et des biomolécules génériques comme l'albumine, les phospholipides, etc.) interagissent fortement avec les cristaux de la phase apatitique et que ces phénomènes d'adsorption contrôlent la nucléation des cristaux d'apatite, leur croissance et dissolution *in vivo* [Glimcher et Muir, 1984; Combes et Rey, 2002]. Ainsi, de nombreuses macromolécules ont été classées comme initiateur ou un inhibiteur de germination et /ou de croissance cristalline [Linde et al., 1989 ; Boskey, 1989]. Dans le domaine des biomatériaux, les interactions de molécules avec les phosphates de calcium interviennent dans l'attachement des cellules (contrôle de la libération d'ions, de principes actifs, de molécules biologiques, contrôle local de l'activité des principes actifs), et sont fortement impliquées dans l'ostéointégration des implants.

Au vu du contexte général de cette étude, il paraît évident que l'étude des processus d'adsorption aux interfaces entre biomatériaux apatitiques et molécules thérapeutiques ouvrirait la voie à de nouvelles stratégies de traitement local des maladies osseuses. Les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'interaction entre principes actifs et phosphates de calcium sont à la base de la conception de matériaux bioactifs inorganiques à fonctionnalités élargies permettant la libération contrôlée d'agents thérapeutiques et de facteurs de croissance.

Nous nous limitons dans cette partie à présenter les principes généraux de l'adsorption ainsi que quelques études réalisées dans ce domaine. Nous nous intéresserons particulièrement aux travaux effectués sur l'interaction de molécules biologiques et à visée thérapeutique avec des phosphates de calcium synthétiques.

IV-2- Adsorption

L'adsorption est un processus intervenant lors de la fixation de molécules d'adsorbat (gaz ou liquide) sur une surface solide (adsorbant). On distingue généralement deux types de processus d'adsorption en fonction des chaleurs de réaction mises en jeu : (i) la physisorption, fait intervenir des liaisons faibles de type forces de Van der Waals lors de la fixation adsorbat-adsorbant, et (ii) la chimisorption qui résulte d'interactions chimiques accompagnées de la formation de liens chimiques entre les molécules d'adsorbat et la surface d'adsorbant.

IV-2-1- Lois d'adsorption

Afin de déterminer les propriétés d'adsorption d'un adsorbant solide au contact d'un liquide (contenant l'adsorbat) ou d'un gaz, différentes lois ont été proposées. Nous nous

sommes intéressés plus particulièrement aux lois de Langmuir et de Freundlich qui sont les plus utilisées dans le cas de l'adsorption liquide-solide [Barroug et al., 1989 ; Rill et al., 2009, Errassifi et al., 2010].

IV-2-1-1- Isotherme de Freundlich

La loi de Freundlich s'applique le plus souvent lorsque la quantité adsorbée est très faible. L'équation caractéristique de cette loi s'écrit :

$$Q = aC^m$$

où Q est la quantité de l'élément adsorbée à la surface de l'adsorbant et C la concentration de l'adsorbat dans la solution; « a » représente l'affinité de l'adsorbat pour la surface de l'adsorbant et m (<1) une constante. Les paramètres caractéristiques a et m sont généralement déterminés à partir de la forme logarithmique de l'équation :

$$\log Q = \log a + m \log C$$

IV-2-1-2- Isotherme de Langmuir

Cette loi suppose que le phénomène d'adsorption peut être considéré comme une réaction équilibrée entre un centre actif de la surface de l'adsorbant et une molécule de l'adsorbat. L'équation caractéristique de la réaction d'équilibre ainsi obtenue s'écrit :

$$Q = \frac{KNC}{1 + KC}$$

où C (mmol/L) est la concentration d'adsorbat en solution à l'équilibre, Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) est la quantité d'adsorbat fixée par unité de surface d'adsorbant, N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) la quantité adsorbée à saturation soit le nombre maximum de sites d'adsorption occupés par unité de surface, et K (L/mmol) est la constante d'affinité de l'adsorbat pour la surface de l'adsorbant.

Les paramètres caractéristiques d'adsorption, K et N, sont déterminés à partir de la linéarisation de l'isotherme de Langmuir qui peut prendre différentes formes [Barroug, 1989] :

$$(1) \frac{1}{Q} = \frac{1}{KN} \frac{1}{C} + \frac{1}{N} ; \quad (2) \frac{C}{Q} = \frac{C}{N} + \frac{1}{KN} ; \quad (3) Q = N - \frac{Q}{KC}$$

IV-2-1-3- Isothermes Langmuir-Freundlich et Töth

Les modèles mathématiques de Langmuir-Freundlich et Töth ne sont que des modèles empiriques, inspirés du modèle de Langmuir, prenant en considération l'hétérogénéité de la surface des sites. Les isothermes de Langmuir-Freundlich et Töth s'expriment respectivement par les relations suivantes :

$$Q = N \frac{(KC)^n}{1 + (KC)^n} \quad \text{et} \quad Q = N \left[\frac{(KC)^n}{1 + (KC)^n} \right]^{1/n}$$

où n représente le paramètre de l'hétérogénéité de surface.

IV-3- Adsorption de biomolécules par des phosphates de calcium apatitiques

De nombreux travaux de recherche visaient à mieux comprendre les processus liés aux propriétés de surface des apatites biologiques au contact du milieu vivant. La procédure consistait généralement à utiliser des phosphates de calcium de synthèse et à examiner leurs propriétés d'adsorption vis-à-vis de molécules d'intérêt biologique. Ces études ont principalement porté sur l'hydroxyapatite et visaient à préciser le rôle des groupements fonctionnels des acides aminés et des protéines dans leur mode d'association avec un phosphate de calcium [Barroug, 1989 ; Gorbunoff et al., 1997 ; Misra et al., 1997].

Au cours des dernières décennies, les apatites nanocristallines sont apparues comme des adsorbants prometteurs, en raison de leurs caractéristiques physicochimiques et biologiques, et de leurs propriétés de surface; elles ont connu un développement considérable. Ainsi, divers adsorbats (ions minéraux, acides aminés, protéines, bisphosphonates, anti-cancéreux...) ont été étudiés afin d'élucider les mécanismes d'interaction se produisant à l'interface de ces matériaux apatitiques. Pour cela les propriétés physico-chimiques des supports étudiés ainsi que les caractéristiques de la solution ont été prises comme variables expérimentales [Errassifi et al., 2010 ; Benaziz et al., 2001 ; Errassifi, 2011 ; Pascaud , 2012]

Les études ont mis en évidence que les propriétés microstructurales des nanocristaux apatitiques (degré de cristallinité, taille et forme des cristallites, surface spécifique) et celles de la surface (charge de surface, couche hydratée riche en espèces non apatitiques labiles), jouent un rôle déterminant dans leur processus d'interactions (adsorption et libération) vis-à-vis d'ions et de molécules présents dans les fluides environnants. La capacité de fixation et de libération des apatites peut être modulée en modifiant les caractéristiques de surface des nanocristaux. Ainsi, le contrôle de ces divers paramètres confère aux apatites nanocristallines un intérêt croissant comme supports ou vecteurs d'agents thérapeutiques *in situ*. Ces apatites offrent une composition et une vitesse de dissolution ajustables qui les rendent appropriées pour la libération contrôlée de médicaments.

Selon la nature des adsorbants et adsorbats étudiés, les isothermes d'adsorption obtenues peuvent être de type Freundlich ou Langmuir ; en outre, le processus peut être décrit comme réversible ou irréversible selon les conditions expérimentales adoptées. L'analyse globale des résultats d'adsorption issus de l'influence de la composition de la solution sur la fixation des molécules d'adsorbat et de l'effet de l'adsorption sur la concentration de certains ions en solution traduisent l'existence d'un processus d'échange impliquant ces espèces à l'interface minéral-milieu environnant. L'étude menée avec des apatites de basse cristallinité à différents stades de maturation confirme l'implication du processus d'échange comme force

motrice [Barroug et al., 2008]. Dans certaines conditions expérimentales (gamme de concentrations élevées en adsorbat) les phénomènes qui interviennent à l'interface entre matériau et milieu environnant peuvent être complexes et s'accompagnent de la dissolution du minéral et de la formation de complexes solubles et/ou insolubles [Errassifi et al., 2014].

Au vue des études menées sur les phosphates de calcium, divers adsorbats de type (macro)moléculaires (principes actifs, protéines, acides aminés,...) ou ioniques ont été examinés. Cependant, peu d'études ont porté sur les antibiotiques [Misra, 1991 ; Bennani, 1998, Cazalbou et al., 2015] et à notre connaissance aucune étude systématique n'a été engagée sur l'interaction d'antibiotiques avec des apatites nanocristallines, bien qu'elles miment au mieux le minéral osseux et qu'elles possèdent des caractéristiques physico-chimiques et structurales intéressantes pour l'adsorption et la libération de molécules bioactives.

CHAPITRE II

SYNTHESE ET CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DE PHOSPHATES ET DE CARBONATES DE CALCIUM

INTRODUCTION

Les phosphates de calcium (CaP) apatitiques constituent la partie minérale des tissus calcifiés et les recherches sur ces composés et les matériaux qui en découlent se sont intensifiées au cours des dernières décennies pour des applications en tant que biomatériaux. La plupart des progrès réalisés dans la connaissance des minéralisations biologiques depuis une vingtaine d'années ont eu pour moteur l'étude des analogues de synthèse [Iafisco et Delgado-López, 2014]. La compréhension des phénomènes qui interviennent à l'interface de ces matériaux au contact de milieux biologiques nécessite une bonne connaissance des caractéristiques physicochimiques de ces phases, et permet d'envisager des applications intéressantes dans le domaine biomédical [Rey et al., 2014].

Dans ce contexte, il nous a paru intéressant de décrire de façon détaillée les méthodes de préparation et les conditions de synthèse des phosphates de calcium qui feront l'objet d'études dans le cadre de ces travaux de thèse. Les caractéristiques physicochimiques des poudres réactives et des produits de synthèse seront définies afin de déterminer le rôle de ces divers facteurs dans les processus qui ont lieu à la surface de ces matériaux.

Dans la première partie de ce chapitre, nous nous intéresserons à l'élaboration et à la caractérisation physico-chimique de phosphates de calcium rencontrés dans les systèmes biologiques. Il s'agit (i) de l'hydroxyapatite stœchiométrique (HA), matériau longtemps considéré comme prototype minéral des tissus calcifiés et qui entre dans la composition de biomatériaux et (ii) d'apatites nanocristallines carbonatées (ANC), apparues au cours des dernières décennies comme étant des composés biomimétiques très prometteurs dans le domaine des substituts osseux [Iafisco et Delgado-López, 2014 ; Dorozhkin, 2009].

La seconde partie de ce chapitre portera sur l'élaboration et la caractérisation physico-chimique de la vaterite et de la brushite, qui serviront de poudres réactives pour la préparation du ciment de référence (CR).

Les composés ainsi préparés seront utilisés comme supports pour l'étude de leur interaction vis-à-vis du fusidate de sodium qui sera présentée dans la première partie du chapitre III.

PARTIE A
SYNTHESE ET CARACTERISATION DE
PHOSPHATES DE CALCIUM
APATITIQUES

Dans cette partie du chapitre nous décrivons l'élaboration et la caractérisation des phosphates de calcium apatitiques qui serviront de supports pour l'étude de l'adsorption du fusidate de sodium présentée au chapitre III. Il s'agit des composés suivants qui ont déjà été décrits dans le chapitre I :

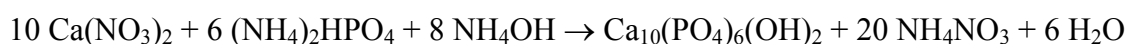
- Hydroxyapatite (HA) : composé stœchiométrique et bien cristallisé, ce matériau est considéré comme le prototype du minéral de l'os et des dents du point de vue de la structure et de la composition ; il entre dans la composition de nombreux biomatériaux de substitution osseuse et dentaire commercialisés et parmi les plus étudiés [Aoki, 1994; Dorozhkin et Epple, 2002 ; Iafisco et Delgado-López, 2014].

- Apatite nanocristalline (ANC) : ce composé est non-stœchiométrique et mal cristallisé ; il se caractérise par une composition et une structure similaires au minéral osseux et par le fait que ces nanocristaux présentent une grande réactivité de surface. Impliqué dans les phénomènes de biominéralisation, les études et les utilisations de ce composé en tant que matériau bioactif destiné aux applications orthopédiques ou dentaires se sont développées ces dernières années [Rey et al., 2007b, 2014].

I- HYDROXYAPATITE STOECHIMETRIQUE

I-1- Synthèse

L'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) a été préparée selon la méthode de double décomposition : celle-ci consiste à effectuer, à température voisine de 90°C, une précipitation relativement lente (3 heures) en milieu basique entre une solution de nitrate de calcium et une solution de phosphate d'ammonium [Trombe, 1972]. La composition des solutions a été choisie à partir des coefficients stœchiométriques correspondant à l'équation suivante :



La composition des solutions de réactifs est la suivante :

Solution cationique : 262,3 g (1,11 mol) de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 1100 mL d'eau permutée décarbonatée.

Solution anionique : 88 g (0,66 mol) d'hydrogénophosphate diammonique $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sont dissous dans 433 mL d'eau permutée décarbonatée.

La solution cationique a été portée à ébullition puis additionnée de 80 mL d'ammoniaque concentré ($d = 0,91$). La solution anionique a été ensuite ajoutée à la solution cationique à 90°C, goutte à goutte à l'aide d'une pompe péristaltique pendant 3 heures. La vitesse d'agitation magnétique dans le milieu de précipitation a été maintenue à 150 $\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$. La présence d'ammoniaque en excès est nécessaire pour maintenir le milieu basique ($\text{pH} = 9$) tout au long de la précipitation de l'HA. Une fois la précipitation terminée, le mélange est maintenu à ébullition et sous agitation pendant une demi-heure.

Le précipité obtenu est filtré à chaud sur Büchner puis lavé abondamment par de l'eau distillée. Il est ensuite lyophilisé pendant 3 jours puis stocké au congélateur.

I-2- Caractérisation

I-2-1- Diffraction des rayons X

Le diagramme de diffraction des rayons X (DRX) du précipité préparé dans les conditions de synthèse qui viennent d'être décrites montre des raies fines et bien résolues, caractéristiques d'une apatite bien cristallisée (Figure II-1). Les positions des pics relatifs au solide précipité sont identiques à celle du fichier de référence JCPDS n°90432 ; le solide obtenu est minéralogiquement pur; en effet, aucune phase étrangère cristallisée autre que l'apatite n'a été décelée.

I-2-2- Spectroscopie Infrarouge

La figure II-2 présente le spectre infrarouge de l'apatite synthétisée. Les attributions ainsi que les intensités relatives des bandes de vibration observées sont consignées dans le tableau II-1. On note la présence de bandes attribuables aux molécules d'eau (vers 3500 cm^{-1}), des ions hydroxyle OH^- (630 et 3570 cm^{-1}) ainsi que des bandes dues aux vibrations des groupements phosphates PO_4^{3-} (vers 1000 - 1100 cm^{-1} et 560 et 600 cm^{-1}) caractéristiques d'environnements apatitiques. On observe également une bande de faible intensité à 875 cm^{-1} ainsi que deux épaulements vers 1140 et 1230 cm^{-1} , correspondant à des groupements hydrogénophosphate HPO_4^{2-} ; la présence de ces espèces en faible quantité, substituées aux groupements PO_4^{3-} , atteste que l'apatite préparée est légèrement sous stœchiométrique.

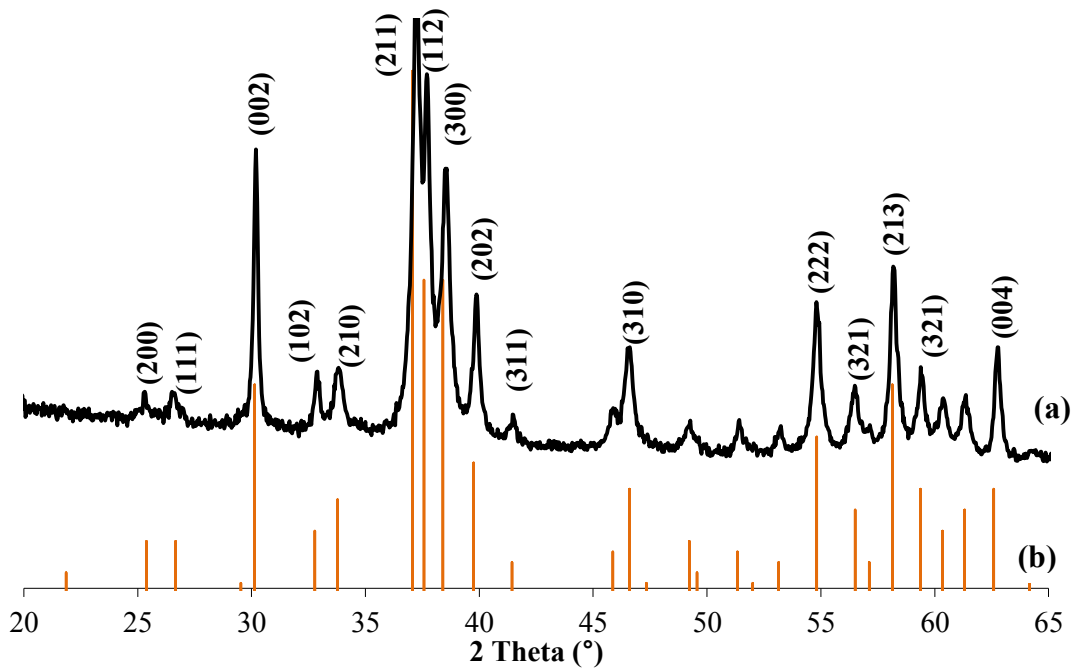


Figure II- 1: Diagramme de diffraction de rayons X de l'hydroxyapatite synthétisée (a) et de de l'hydroxyapatite de référence (fiche JCPDS 90432) (b).

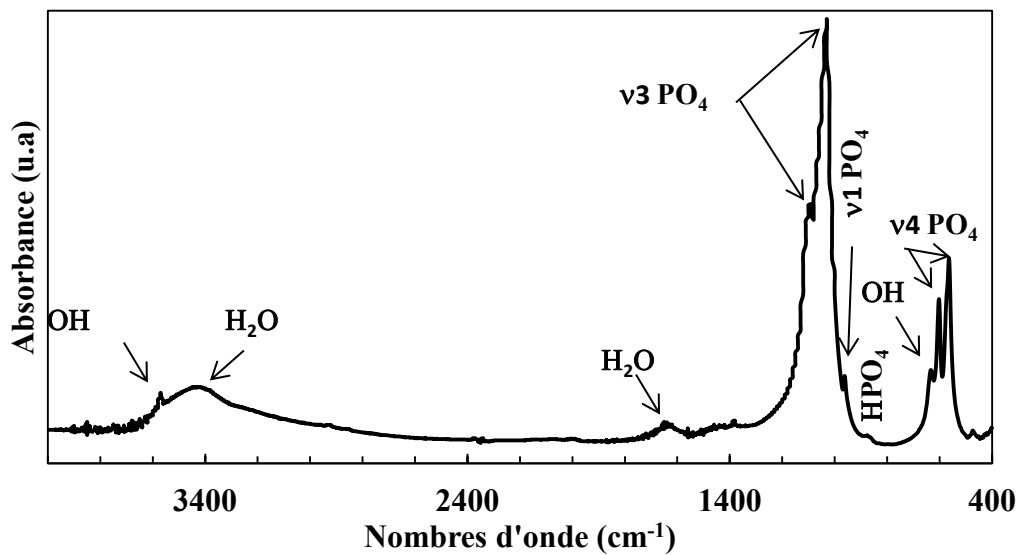


Figure II-2: Spectre infrarouge de l'hydroxyapatite synthétisée.

Tableau II-1 : Positions et intensités des bandes infrarouges de l'hydroxyapatite synthétisée
(*m*: moyenne; *f*: faible ; *ép*: épaulement ; *i* : intense ; *l*: large).

Position des bandes (cm ⁻¹)	Intensité des bandes	Attribution des bandes
3000-3400	<i>m</i>	Elongation symétrique et antisymétrique des molécules d'eau
3570	<i>ép</i>	Elongation symétrique des ions OH ⁻ mode ν_5
1630	<i>f</i>	Déformation des molécules d'eau
1087 1046	<i>i, l</i> <i>i, l</i>	Elongation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_3
962	<i>m</i>	Elongation symétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_1
875 633	<i>f</i> <i>i</i>	Elongation P-OH des groupements HPO ₄ ²⁻ Libration ν des OH ⁻
571 601	<i>i</i> <i>i</i>	Déformation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_4
474	<i>f</i>	Déformation symétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_2

II- APATITE NANOCRISTALLINE CARBONATEE

II-1- Synthèse

La synthèse de l'apatite nanocristalline carbonatée (ANC) est réalisée à température ambiante par double décomposition entre une solution aqueuse de nitrate de calcium et une solution aqueuse contenant de l'hydrogénophosphate di-ammonique et de l'hydrogencarbonate de sodium [Rey et al. 1995b].

Les solutions de réactifs pour la synthèse ont la composition suivante :

Solution cationique : 52,2 g (0,22 mol) de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 750 mL d'eau permutée.

Solution anionique : 90 g (0,68 mol) de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ainsi que 90 g (1,07 mol) de NaHCO_3 sont dissous dans 1500 mL d'eau permutée.

La solution cationique a été versée rapidement à température ambiante dans la solution anionique. La suspension obtenue est agitée durant quelques secondes afin d'assurer l'homogénéité; le pH mesuré est proche de 7,4. Le précipité formé est ensuite laissé à maturer sans agitation, dans un récipient totalement hermétique afin d'éviter toute perte (ou fixation) de gaz carbonique.

Après une durée de maturation de 15 jours, le précipité obtenu est filtré, lavé avec 2 litres d'eau désionisée, lyophilisé, puis conservé au congélateur afin d'éviter toute éventuelle évolution. Le choix de la durée de maturation de 15 jours se justifie par le fait que l'apatite obtenue dans ces conditions est suffisamment stable pour ne pas évoluer significativement lors de l'étude d'adsorption qui sera présentée dans le chapitre III.

II-2- Caractérisation

II-2-1- Diffraction des rayons X

La figure II-3 présente le diagramme de diffraction des rayons X du composé synthétisé. On observe des raies larges et mal résolues caractéristiques d'une apatite phosphocalcique nanocristalline de basse cristallinité analogue à la phase minérale du tissu osseux [Errassifi, 2011]. Par ailleurs, aucune phase cristalline autre que l'apatite n'a été décelée dans notre préparation. L'indexation des raies de diffraction de RX obtenues a été réalisée en se basant sur les raies de diffraction d'une hydroxyapatite de référence, apatite phosphocalcique de haute cristallinité (Fiche JCPDS n° 90432).

II-2-2- Spectroscopie infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge du solide synthétisé est caractéristique d'une apatite nanocristalline carbonatée (Figure II-4), en accord avec l'état de basse cristallinité observé par DRX. Les positions des différentes bandes observées ainsi que leurs attributions sont regroupées dans le tableau II-2.

Les bandes d'absorption observées sont principalement dues aux groupements phosphates apatitiques : les bandes multiples situées entre 1006 cm^{-1} et 1104 cm^{-1}

correspondent au mode ν_3 d'élongation antisymétrique et celle observée à 961 cm^{-1} au mode d'élongation symétrique ν_1 . Les déformations angulaires des PO_4^{3-} induisent quant à elles des bandes d'absorption entre 562 et 603 cm^{-1} (mode ν_4) et à 469 cm^{-1} (mode ν_2). Ces spectres comportent aussi les bandes d'absorption des liaisons C-O des carbonates à $866-880\text{ cm}^{-1}$ (mode ν_2) et à $1420-1540\text{ cm}^{-1}$ (mode ν_3).

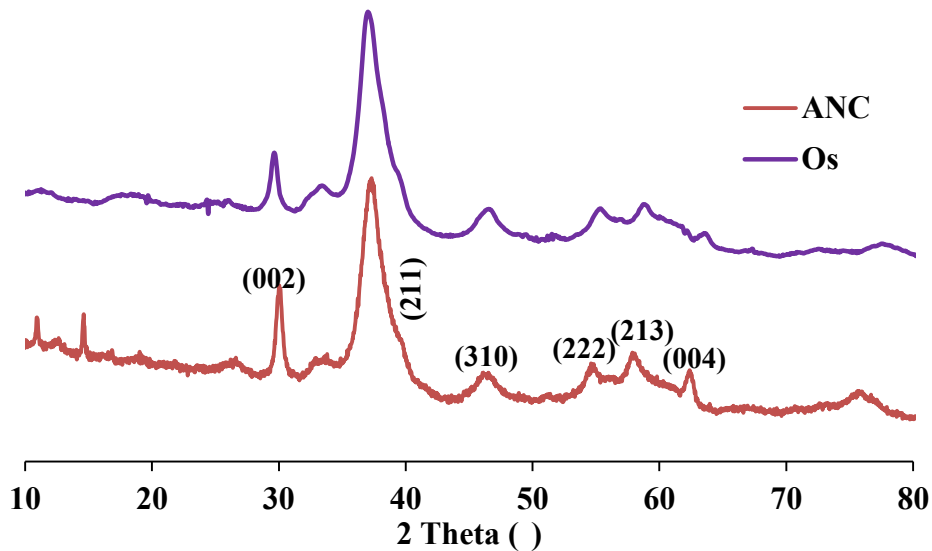


Figure II-3: Diagramme de diffraction des rayons X de l'apatite nanocristalline préparée (ANC) comparé à celui de l'os d'un rat âgé de 2 ans.

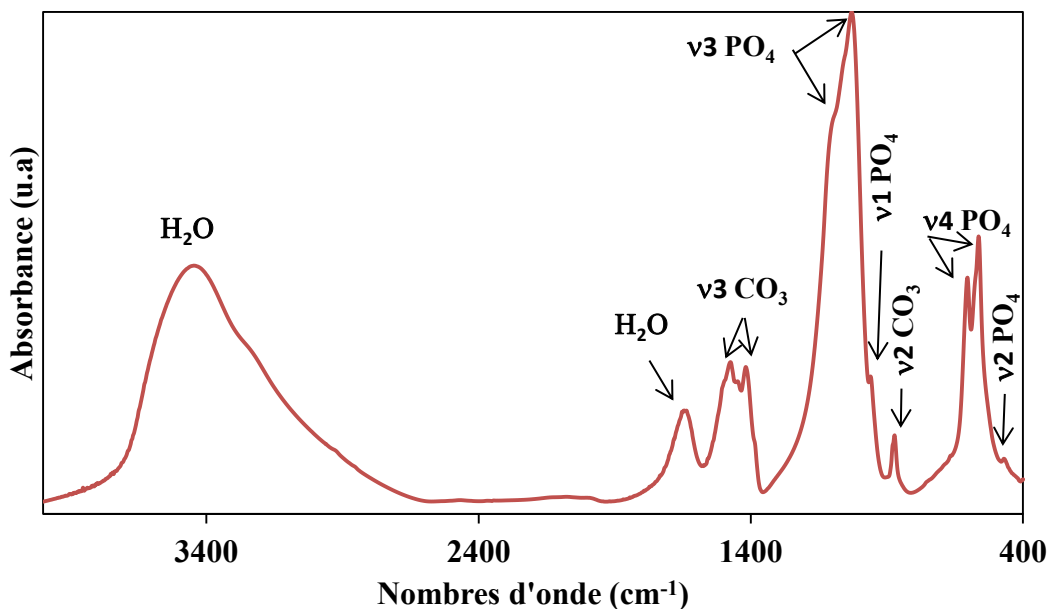


Figure II-4: Spectre infrarouge de l'apatite nanocristalline carbonatée synthétisée.

Tableau II-2 : Positions et intensités des bandes d'absorption infrarouge de l'apatite nanocristalline synthétisée (*m*: moyenne; *f*: faible ; *ép*: épaulement ; *i* : intense ; *l*: large).

Position des bandes (cm ⁻¹)	Intensité des bandes	Attribution des bandes
3000-3400	<i>i, l</i>	Elongation symétrique et antisymétrique des molécules d'eau
1644	<i>f</i>	Déformation des molécules d'eau
1476 1419	<i>m</i> <i>m</i>	Elongation C-O des ions CO ₃ ²⁻ mode ν_3
1140	<i>m</i>	Elongation P-OH des groupements HPO ₄ ²⁻
1093 1033	<i>i, l</i> <i>i, l</i>	Elongation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_3
961	<i>m</i>	Elongation symétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_1
878 871	<i>f</i> <i>ép</i>	Elongation C-O des ions CO ₃ ²⁻ mode ν_2
604 563	<i>i</i> <i>i</i>	Déformation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_4

PARTIE B
SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION
PHYSICOCHIMIQUE DES POUDRES
REACTIVES
ET DU CIMENT DE RÉFÉRENCE

L'élaboration du ciment est réalisée à partir d'eau et d'un mélange de deux sels de calcium : un polymorphe de carbonate de calcium appelé vatérite (CaCO_3) et un phosphate de calcium nommé phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) ou brushite de formule chimique $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Le mélange de ces deux composés avec de l'eau conduit, selon un processus de dissolution-reprécipitation, à la formation d'un ciment mixte constitué de phosphate de calcium (CaP) apatitique analogue au minéral osseux et de carbonate de calcium résiduel (vatérite) ; ce ciment mixte sera noté ciment CaP- CaCO_3 .

La première partie de ce chapitre présentera la synthèse et la caractérisation physico-chimique des deux poudres réactives, à savoir la brushite et la vatérite ; la deuxième partie quant à elle sera consacrée à l'élaboration et à la caractérisation du ciment mixte CaP- CaCO_3 . Celui-ci sera considéré comme le ciment de référence pour l'ensemble de ces travaux de thèse.

I- SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES POUDRES RÉACTIVES

Dans cette première partie, nous présenterons la synthèse et la caractérisation du phosphate dicalcique dihydraté $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et de la vatérite CaCO_3 .

La synthèse de ces deux poudres se fait par double décomposition en milieu aqueux à température ambiante. Le principe consiste à dissoudre dans une solution A les sels contenant les cations (calcium) et dans une solution B les sels contenant les anions (phosphates ou carbonates). La solution A est ensuite versée dans la solution B. Ceci a pour effet l'apparition d'un précipité de phosphate ou de carbonate de calcium. Tous ces produits étant métastables en solution, ils sont filtrés, lavés puis séchés par lyophilisation et ensuite stockés à -20°C afin d'éviter toute évolution avant leur utilisation.

I-1- Brushite

I-1-1- Introduction

La brushite, ou phosphate dicalcique dihydraté (DCPD), est un phosphate de calcium acide de formule $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ qui cristallise généralement sous forme de plaquettes, mais qui peut également prendre l'aspect d'aiguilles.

Ce composé a été découvert en 1865 par Brown et Moore [Moore et al., 1865] dans du guano (excréments d'oiseaux marins ou de chauve-souris) sur un cargo de Californie en provenance des îles des Caraïbes. Il est formé par l'interaction de guano avec la calcite à un pH faible [Ray et al., 2011] ; son nom est choisi en hommage au minéralogiste Brush [Moore et al., 1865]. Outre les dépôts de guano, la brushite se trouve à l'état naturel dans des grottes et des roches phosphatées [Fiore et al., 1991; Anthony et al., 2005].

La brushite a été identifiée dans certaines calcifications pathologiques telles que les calculs dentaires ou rénaux ainsi que dans les caries [Bazin et al., 2012]. Plusieurs auteurs ont suggéré que ce composé est un précurseur de la minéralisation osseuse, et notamment des

apatites biologiques [Roufosse et al., 1979 ; Glimcher et al., 1981]. Dans le domaine des matériaux de reconstruction osseuse et dentaire, des ciments à base de brushite ont été mis au point et proposés comme substituts osseux [Mirtchi et al., 1989]. Par ailleurs, la brushite entre dans la formulation de dentifrices, de retardateurs de flamme, ou d'agents fertilisants. Composé alimentaire, le DCPD est identifié sous le nom E341 par la classification européenne des additifs alimentaires [Dorozhkin, 2009].

I-1-2- Synthèse et caractérisation de la brushite

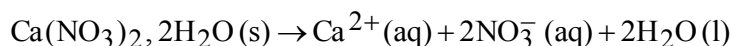
I-1-2-1- Synthèse

Le phosphate dicalcique dihydraté a été préparé par double décomposition entre une solution de nitrate de calcium (A) et une solution ammoniacale de phosphate d'ammonium (B). Cette méthode permet d'obtenir environ 60 g de brushite par synthèse.

Les solutions de réactifs pour la synthèse ont la composition suivante :

Solution A : 86,74 g de nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) dissous dans 600 mL d'eau désionisée.

La réaction de dissolution s'écrit :

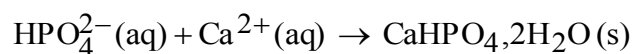


Solution B : 42,26 g de dihydrogénophosphate d'ammonium ($\text{H}_2\text{PO}_4\text{NH}_4$) dissous dans 1400 mL d'eau désionisée, additionnés de 20 mL d'ammoniaque (NH_4OH) à 20 %.

La réaction est donnée par l'équation :



Après dissolution totale des sels, la solution A est versée dans la solution B ; on maintient le pH aux alentours de 5,5 tout au long de la précipitation par ajout de NH_4OH afin de favoriser la présence de la forme $\text{HPO}_4^{2-}(\text{aq})$ et permettre ainsi la formation de la brushite selon la réaction :



On laisse mûrir le précipité dans la solution mère pendant 5 heures à température ambiante et sans agitation. Le précipité est ensuite filtré sur Büchner et lavé avec deux litres d'eau désionisée. Le précipité obtenu est lyophilisé ; on récupère alors environ 60 g de brushite, sous forme d'une poudre blanche d'aspect cotonneux.

Les caractéristiques du produit obtenu ont été vérifiées moyennant différentes techniques d'analyses physicochimiques.

I-1-2-2- Caractérisation de la brushite

La brushite a été analysée par diffraction des rayons X (DRX), par spectrophotométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ainsi que par microscopie électronique à balayage (MEB).

I-1-2-2-1- Diffraction des rayons X

Le diagramme de DRX du précipité préparé dans les conditions de synthèse décrites (Figure II-5) montre des raies fines et résolues, caractéristiques de la brushite. Le solide préparé est minéralogiquement pur; en effet, aucune phase étrangère cristallisée autre que la brushite n'a été décelée. Toutefois, il est à noter que les intensités relatives de certaines raies de la brushite synthétisée diffèrent de celles de la brushite de référence; malgré ces différences qui sont liées à la morphologie des cristaux (plaquettes très fines cf. plus loin MEB) et/ou à la préparation de l'échantillon pour les DRX, l'échantillon préparé est pur.

I-1-2-2-2- Spectroscopie infrarouge

La figure II-6 présente le spectre IR de la brushite synthétisée. Les attributions ainsi que les intensités relatives des bandes de vibration observées sont consignées dans le tableau II-3 [Petrov et al., 1967; Tortet et al., 1997; Trpkovska et al., 1999].

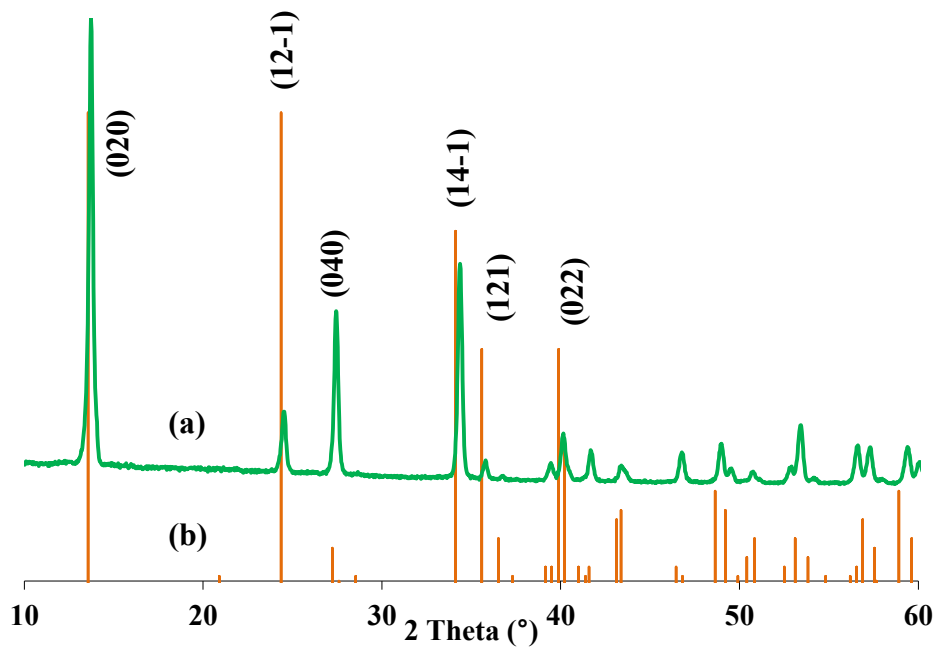


Figure II-5 : Diagramme de diffraction des RX (a) de la brushite synthétisée et (b) de la brushite de référence (fiche JCPDS 90077). .

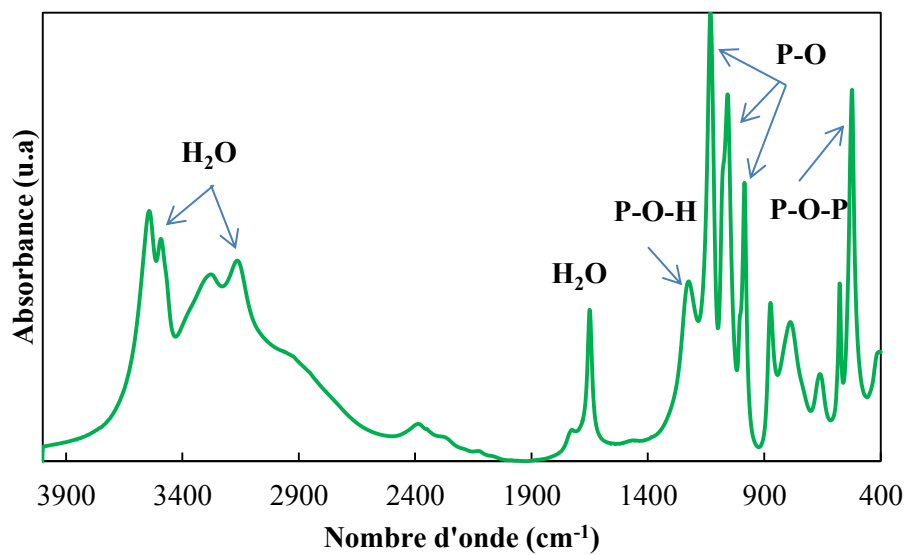


Figure II-6: Spectre infrarouge de la brushite synthétisée.

Tableau II-3 : Positions, attributions et intensités des bandes IR de la brushite

(*i* : intense ; *m*: moyenne; *f*: faible; *ép* : épaulement).

Position (cm ⁻¹) des bandes	Intensité des bandes	Attribution des bandes
3543	<i>i</i>	O-H (H ₂ O de structure) élongation
3489	<i>i</i>	
3280	<i>i</i>	
3166	<i>i</i>	
2930	<i>é</i>	(P)O-H élongation
2380	<i>i</i>	harmoniques ou combinaisons des P-O-H bandes à 1220 cm ⁻¹ , 1074 cm ⁻¹ et 1059 cm ⁻¹
2282	<i>ép</i>	
2130	<i>ép</i>	
1727	<i>f</i>	H ₂ O Combinaison de déformation et de rotation d'eau résiduelle
1650	<i>i</i>	H ₂ O de structure déformation
1220	<i>i</i>	P-O-H déformation dans le plan
1132	<i>i</i>	P-O élongation
1074	<i>ép</i>	
1059	<i>i</i>	
1004	<i>ép</i>	
985	<i>i</i>	
874	<i>i</i>	P-O(H) élongation
1004	<i>i</i>	P-O-H déformation hors du plan de P-(OH) H ₂ O de structure libration
746	<i>ép</i>	
661	<i>m</i>	H ₂ O de structure libration
576	<i>m</i>	O-P-O(H) déformation
524	<i>i</i>	

I-1-2-2-3- Microscopie électronique à balayage

L'examen de la poudre synthétisée par microscopie électronique à balayage montre que la brushite se présente majoritairement sous forme de grandes plaquettes fines (figure II-7), de quelques dizaines de nanomètres à deux micromètres d'épaisseur et de quelques dizaines de micromètres de long.

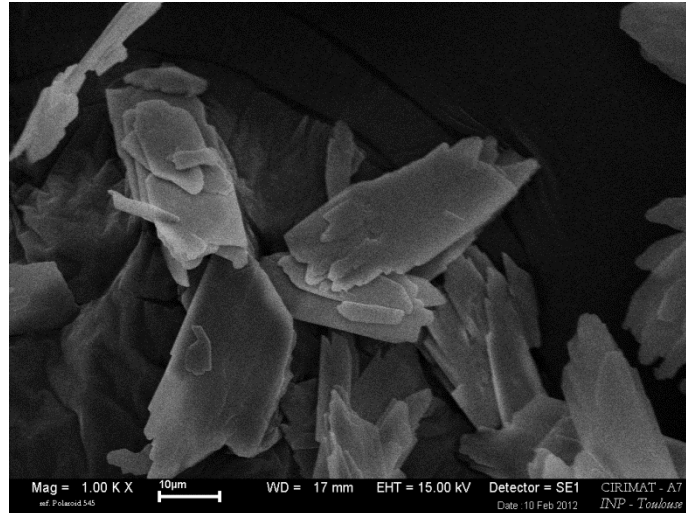


Figure II-7: Micrographie MEB de la brushite synthétisée.

I-2- Vatérite

I-2-1- Introduction

La vatérite est un polymorphe métastable de carbonate de calcium (CaCO_3). C'est une poudre blanche constituée généralement de particules de forme sphérique avec une structure interne poreuse. Le diamètre des particules de vatérite est en général compris entre 0,05 et 5 μm . Comme l'aragonite, la vatérite est une phase métastable de CaCO_3 dans des conditions de températures ambiantes. Etant moins stable en solution que la calcite ou l'aragonite, la vatérite a une solubilité supérieure à ces deux phases. Par conséquent, la vatérite se transforme en calcite ou aragonite une fois exposée à l'eau. Les températures inférieures à 60°C facilitent la formation de calcite, tandis qu'aux températures plus élevées, la vatérite se transforme en aragonite [McConnell et al., 1960 ; Sato et al., 1969] .

Malgré sa métastabilité, la vatérite peut être rencontrée dans la nature ; par exemple la vatérite se trouve dans les otolithes de poissons, les perles d'eau douce, les cicatrices guéries de certaines coquilles de mollusques, les calculs biliaires et les calculs urinaires [Demichelis et al., 2012] . Dans ces conditions, certaines impuretés (ions métalliques ou matière organique) peuvent stabiliser la vatérite et empêcher sa transformation en calcite ou aragonite.

La vatérite a été utilisée comme additif dans une large gamme de produits de soins personnels. Les particules de vatérite peuvent agir comme des abrasifs, des absorbants, des

agents antiagglomérants, des tampons, des charges, des colorants, des stabilisants d'émulsion [Cui et al., 2012]. La vaterite trouve aussi plusieurs applications dans le domaine biomédical en tant que constituants dans les ciments osseux et aussi les implants dentaires [Combes et al., 2006 ; Ohgushi et al., 1992 ; Nakamura et al., 2013 ; Ma et al., 2010 ; Brito et al., 2009].

La vaterite peut être produite par plusieurs méthodes, mais la majorité d'entre elles exigent des conditions extrêmes et des équipements spéciaux. La principale méthode de fabrication industrielle est basée sur le barbotage de CO_2 dans une solution contenant du calcium, appelée également approche Kitano [Nehrke et al., 2006 ; Han et al., 2005]. Parmi les autres méthodes utilisées on trouve la double émulsion [Fujiwara et al., 2010], la croissance solvothermale en autoclave au-dessus de 100°C [Li et al., 2002], et la biominéralisation [Wang et al., 2010 ; Rodriguez-Navarro et al., 2007].

La composition et la morphologie du polymorphes de CaCO_3 sont très sensibles aux conditions de synthèse. De nombreux efforts ont été faits pour favoriser la croissance de la vaterite sur les autres variétés polymorphes de carbonate de calcium. Diverses conditions expérimentales sont censées favoriser la synthèse de cette phase métastable. Parmi celles-ci, l'utilisation de solutions hautement saturées en sel, de pH alcalin, et le contrôle de la température conduisent à la formation de la vaterite avec un rendement élevé [Chen et al., 2009 ; Zhao et al., 2013].

Les sources d'ions calcium et carbonate ont un effet significatif sur la morphologie et la phase du CaCO_3 qui précipite. Le sel du calcium CaCl_2 semble être le composé le plus utilisé dans la synthèse de vaterite [Fujiwara et al., 2010 ; Qui et al., 2012] ; on trouve également le nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ mais il est moins fréquemment utilisé. Pour les ions carbonate, la source la plus courante est le carbonate de sodium Na_2CO_3 [Rieger et al., 2007] ; il y a également d'autres sources telles que le bicarbonate de sodium NaHCO_3 [Yao et al., 2009], le carbonate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ [Huang et al., 2008 ; Fujiwara et al., 2010], et le bicarbonate d'ammonium NH_4HCO_3 [Chen et al., 2009].

La synthèse de la vaterite au sein de notre laboratoire se fait selon la méthode de double décomposition qui est décrite ci-après. La précipitation est facile à réaliser et relativement rapide et reproductible.

I-2-2- Synthèse et caractérisation de la vaterite

I-2-2-1- Synthèse

La vaterite a été préparée par double décomposition entre une solution de chlorure de calcium (A) et une solution de carbonate de sodium (B). L'ajout de la solution A dans B se fait à l'aide d'une pompe péristaltique (Figure II-8).

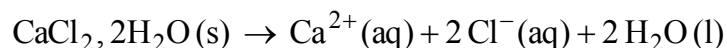


Figure II- 8: Montage expérimental de la synthèse de vatérite

La composition des solutions réactives pour la synthèse est la suivante :

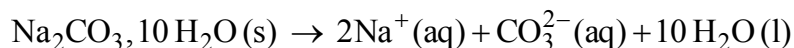
Solution A : 36,75 g de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) dissous dans 250 mL d'eau désionisée.

La réaction de dissolution est donnée par l'équation suivante :



Solution B : 26,50 g de carbonate dissodique (Na_2CO_3) dissous dans 250 mL d'eau désionisée.

La réaction de dissolution s'écrit :

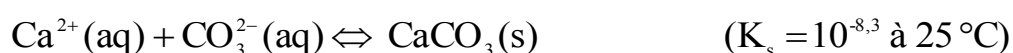


Après dissolution totale des sels, la solution A est versée dans la solution B à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit fixé à 15 mL/min et à température ambiante. Cette pompe permet de contrôler la vitesse d'ajout de A dans B et donc un contrôle de la variété polymorphe de CaCO_3 qui se forme (vatérite).

La solution B est agitée de manière vigoureuse, et devient trouble lors de l'ajout de la solution de calcium. Un gel peu visqueux se forme, puis la solution prend rapidement un aspect blanc laiteux. Nous avons pu observer que lors du mélange des deux solutions, la viscosité du milieu augmentait au fur et à mesure de la précipitation jusqu'à arriver à un état proche d'un gel gênant l'agitation ; l'homogénéisation de la suspension a été effectuée à l'aide d'une agitation magnétique.

Le précipité blanc formé est alors filtré rapidement sur Büchner et lavé avec 1,5 litre d'eau désionisée, puis lyophilisé. La quantité de poudre de vatérite obtenue selon cette méthode (environ 50 g) est conservée ensuite au congélateur.

La réaction de formation de la vatérite s'écrit :



I-2-2-2- Caractérisation

La vatérite préparée a été caractérisée par diffraction des rayons X, spectroscopie infrarouge, et par microscopie électronique à balayage.

I-2-2-2-1- Diffraction des rayons X

Le diagramme de diffraction des rayons X de la poudre de vatérite synthétisée est présenté sur la figure II-9. Sa comparaison avec les pics de diffraction d'une vatérite de référence (fiche JCPDS 330268) permet de vérifier la pureté et la cristallinité du composé synthétisé.

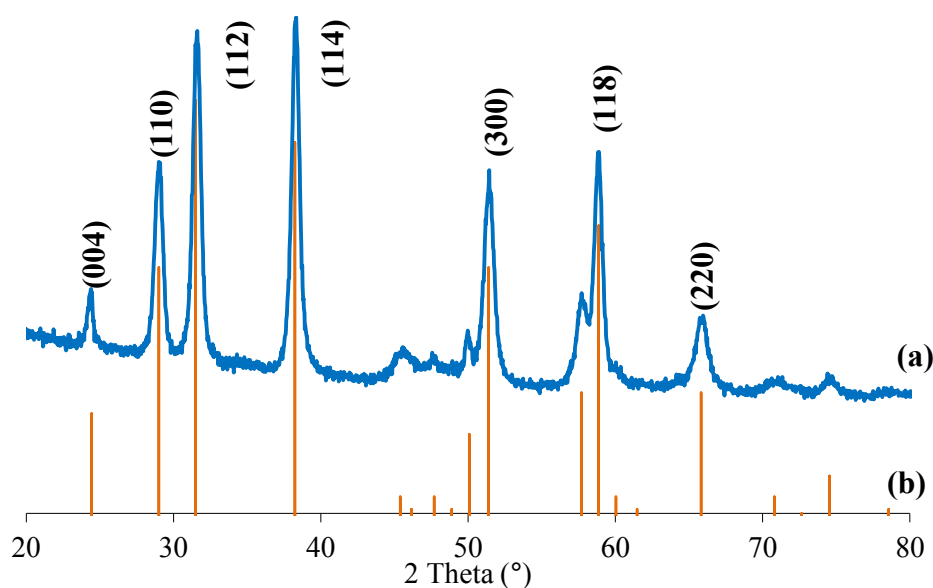


Figure II-9 : Diagramme de diffraction des rayons X de (a) la vatérite synthétisée et (b) de la vatérite de référence (fiche JCPDS 330268).

I-2-2-2-2- Spectroscopie infrarouge

La figure II-10 présente le spectre infrarouge de la vatérite synthétisée. Les attributions ainsi que les intensités relatives des bandes de vibration observées sont consignées dans le tableau II-4 [Andersen et al., 1991] : on note la présence de bandes vers 3430 cm^{-1} attribuables à des molécules d'eau, des bandes entre 1400 et 1500 cm^{-1} dues à la vibration ν_3 des carbonates, doublement dégénérée, et des bandes ν_1 et ν_2 à 1088 cm^{-1} et 876 cm^{-1} respectivement. La vibration ν_4 quant à elle apparaît nettement à 745 cm^{-1} .

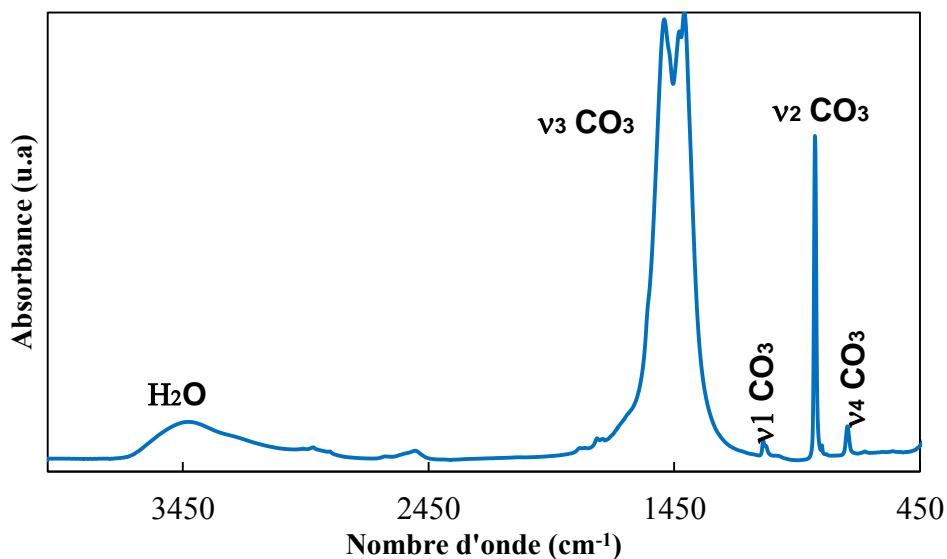


Figure II-10 : Spectre infrarouge de la vaterite synthétisée.

Tableau II- 4 : Positions, attributions et intensités des bandes IR de la vaterite (*i* : intense ; *m* : moyenne; *f* : faible ; *f* : forte; *tf* : très forte ; *ép* : épaulement).

Position (cm ⁻¹) des bandes	Intensité des bandes	Attribution des bandes
3430	<i>m</i>	Eau de surface
2626, 2548, 2508	<i>f ou ép</i>	Combinaisons $\nu_1 + \nu_3 \text{CO}_3^{2-}$
1835, 1814, 1764, 1740	<i>ép</i>	Combinaisons $\nu_1 + \nu_4 \text{CO}_3^{2-}$
1492 1471 1430 1403	<i>i</i> <i>ép</i> <i>ép</i> <i>i</i>	$\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$ - élongations asymétriques C-O
1088 1078	<i>m</i> <i>f</i>	$\nu_1 \text{CO}_3^{2-}$ - élongations symétriques C-O
876 849 831	<i>i</i> <i>f</i> <i>tf</i>	$\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$ - déformation CO_3^{2-} hors du plan combinaison $\nu_4 \text{CO}_3^{2-}$ + vibrations du réseau ou levée de dégénérescence due au groupe facteur
745 675	<i>m</i> <i>tf</i>	$\nu_4 \text{CO}_3^{2-}$ - déformation CO_3 dans le plan

I-2-2-2-3- Microscopie électronique à balayage

L'observation par MEB de la vatérite montre des particules sous forme de « lentilles », de taille allant de 0,5 à 2 μm (Figure II-11).

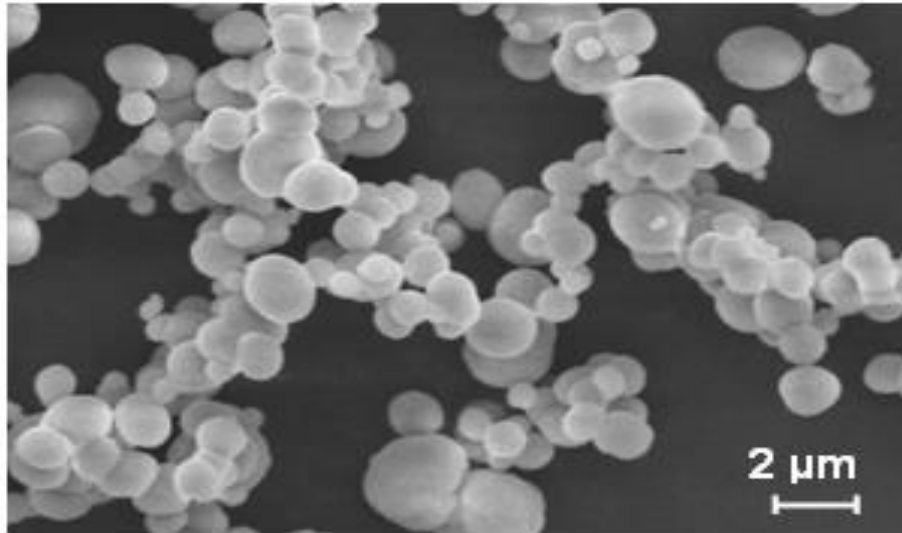
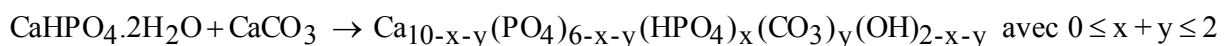


Figure II-11 : Micrographie MEB de la vatérite synthétisée.

II- ETUDE DU CIMENT DE REFERENCE

Le ciment étudié dans ce travail de thèse a été mis au point par l'équipe Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux du CIRIMAT [Fontaine et al., 2001]. La faisabilité et la cytocompatibilité de ce ciment de référence ont été démontrées [Combes et al., 2006-a ; Combes et al., 2006-b] .

Ce ciment a été préparé à partir de la brushite et de la vatérite (50/50), La réaction de prise du ciment conduit à une apatite non stœchiométrique déficiente en calcium pouvant admettre plusieurs substitutions. On peut donc supposer que la formule générale de l'apatite formée est :



La réaction de prise du ciment se fait en trois étapes : la dissolution des réactifs, la germination de la nouvelle phase (apatite) et la croissance des cristaux. Par conséquent, la réaction de prise est un processus de dissolution-précipitation. Lors de la dissolution, les poudres réactives libèrent des ions calcium, carbonate et phosphate, générant une sursaturation de la phase aqueuse. Une fois que la concentration ionique atteint une valeur critique, la germination de la nouvelle phase se produit, généralement à la surface des particules non dissoutes de réactifs. Ensuite, les cristaux de la nouvelle phase vont croître grâce à l'apport d'ions issus de la dissolution des réactifs. Pendant les premières heures, le

processus est contrôlé par la cinétique de dissolution des matières premières ; lorsque la nouvelle phase recouvre les particules réactives, le processus devient contrôlé par la diffusion à travers cette couche de la nouvelle phase [Ginebra et al., 2012].

Cette partie de l'étude s'attache à décrire l'élaboration du ciment, ses principales caractéristiques physico-chimiques et à examiner les mécanismes mis en jeu lors de sa prise.

II-1- Elaboration du ciment de référence

Le principe de base de ce ciment repose sur la réactivité d'un mélange bi-phasique de poudres incluant la vatérite et la brushite. La phase solide du ciment CaP-CaCO₃ est constituée pour moitié de vatérite et pour moitié de brushite (proportions massiques). Elle est gâchée avec la phase liquide, de l'eau désionisée, dans un rapport L/S = 0,7. La Figure II-12 regroupe les différentes étapes qui interviennent dans l'élaboration du ciment mixte.

La réaction de prise a été étudiée *in-vitro* en plaçant le ciment dans une atmosphère saturée en eau dans une étuve à 37°C (température physiologique) pendant 48 heures.

II-2- Caractérisation du ciment de référence

Le ciment de référence a été caractérisé par diffraction des rayons X, spectroscopie infrarouge et par microscopie électronique à balayage.

II-2-1- Diffraction des rayons X

La Figure II-13 regroupe les diagrammes de diffraction des RX du ciment de référence préparé, des réactifs (vatérite et brushite), d'une apatite carbonatée maturée 30 jours ainsi que celui du minéral osseux. L'étude comparée montre que les raies du diagramme RX du ciment (CR) sont caractéristiques de celle d'une apatite mal cristallisée, qui s'apparente à celle du minéral osseux. Outre la phase apatitique, on remarque la présence de raies caractéristiques de la vatérite résiduelle. Cependant, la brushite n'apparaît pas sur le diagramme du ciment de référence, ce qui laisse penser qu'elle a été entièrement consommée pendant la réaction de prise.

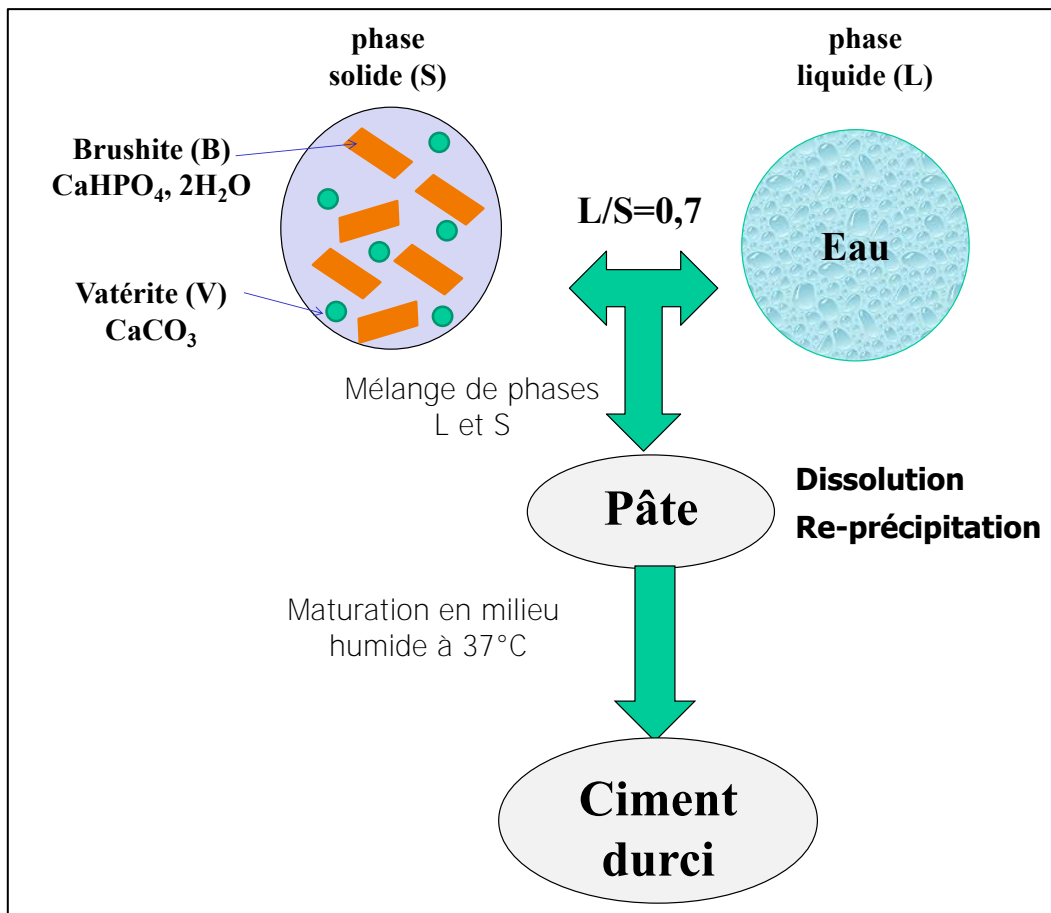


Figure II-12 : Etapes de l'élaboration du ciment de référence.

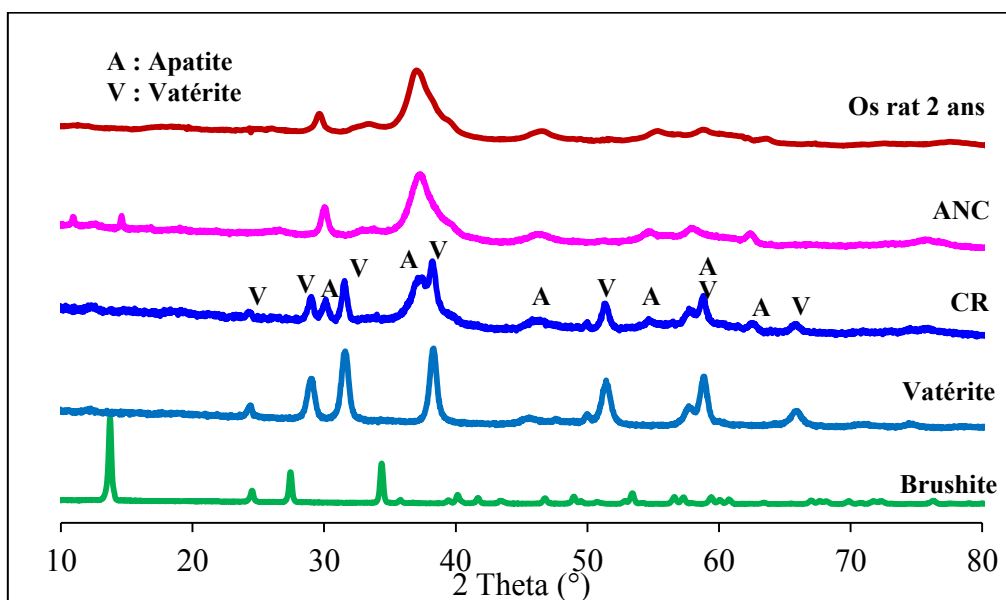


Figure II-13 : Diagrammes de diffraction des rayons X du ciment de référence (CR), de la brushite (B), de la vaterite (V), d'une apatite nanocristalline carbonatée maturée 15 jours (ANC), et d'un os de rat (2 ans).

II-2-2- Spectroscopie infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge d'un ciment de référence (CR) totalement pris, de la vatérite et d'une apatite nanocristalline carbonatée sont présentés sur la Figure II-14. Le spectre du ciment met bien en évidence la présence de bandes caractéristiques d'une apatite carbonatée analogue au minéral osseux, ainsi que des bandes supplémentaires correspondant à la vatérite. Les bandes caractéristiques de la brushite, quant à elles, ne figurent pas dans le spectre du ciment. L'analyse par spectroscopie infrarouge confirme ainsi les observations faites par diffraction des rayons X.

Les positions des différentes bandes observées ainsi que leurs attributions sont regroupées dans le tableau II-5. La bande large et intense dans le domaine 3000-3400 cm^{-1} témoigne de la présence d'eau adsorbée à la surface des nanocristaux ou éventuellement d'eau intracristalline [LeGeros et al., 1978]. Les bandes dans les domaines 1000-1150 cm^{-1} et 550-650 cm^{-1} correspondent respectivement aux modes ν_3 et ν_4 des groupements phosphate situés dans des sites apatitiques. La bande à 961 cm^{-1} est attribuée à $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ et l'épaulement vers 1140 cm^{-1} correspond aux ions HPO_4^{2-} dans le réseau apatitique.

Le domaine $\nu_4 \text{PO}_4$ qui se situe entre 450 et 700 cm^{-1} a été utilisé pour caractériser plus finement l'apatite, notamment la teneur en ions HPO_4^{2-} dans la structure apatitique ou dans la couche hydratée [Rey et al., 1991a et 1995b ; Eichert et al., 2007]. Nous nous proposons de faire une décomposition des différentes bandes de ce domaine. Pour cela, nous avons opéré des traitements mathématiques de décomposition sur la région spectrale sélectionnée en utilisant le logiciel GRAMS/AI version 8.0. Ces décompositions, conformément aux différents travaux effectués dans ce domaine [Rey et al., 1991a et 1995b ; Eichert et al., 2007], ont été réalisées en considérant une forme de bande lorentzienne pour chaque bande IR. Le modèle utilisé pour décomposer ce domaine est présenté dans tableau II-6. L'attribution des bandes correspondant au domaine $\nu_4 \text{PO}_4$ est indiquée sur la figure II-15. On note la présence de la bande caractéristiques des groupements HPO_4 labiles située vers 532 cm^{-1} et celle correspondant aux HPO_4 apatitiques située vers 550 cm^{-1} . On note également la présence de bandes spécifiques aux groupements PO_4 apatitiques situées à 602, 576, et 561 cm^{-1} et aux groupements PO_4 labiles située à 617 cm^{-1} . En ce qui concerne la vibration de bandes carbonate, les études menées sur l'apatite nanocristalline carbonatée révèlent l'apparition des modes ν_3 et ν_2 des groupements carbonates dans les sites apatitiques respectivement dans les domaines 1350-1500 cm^{-1} et 850-900 cm^{-1} . Le premier domaine met en évidence deux bandes vers 1419 cm^{-1} et 1470 cm^{-1} caractéristiques d'ions carbonate localisés dans les sites PO_4 (carbonates de type B c'est-à-dire occupant les sites des ions phosphates de l'HA) [Rey et al., 1989b; Elliott et al., 1994] ; la deuxième région spectrale (850-900 cm^{-1}) fait apparaître une bande à 871 cm^{-1} attribuée aux vibrations des carbonates type B, et un épaulement vers 879 cm^{-1} attribué aux carbonates qui occupent les sites monovalents de la structure apatitique

(carbonate de type A c'est-à-dire occupant les sites des ions hydroxyde de l'HA) [Eichert et al., 2007; Kafak et al., 2011].

Dans notre cas, le ciment de référence renferme en plus de l'apatite, la vaterite résiduelle même en fin de réaction chimique de prise : on assiste à la superposition des bandes de vibration intenses des carbonates de la vaterite et celles des carbonates apatitiques, ce qui empêche une analyse plus fine du domaine spectral des carbonates du ciment de référence.

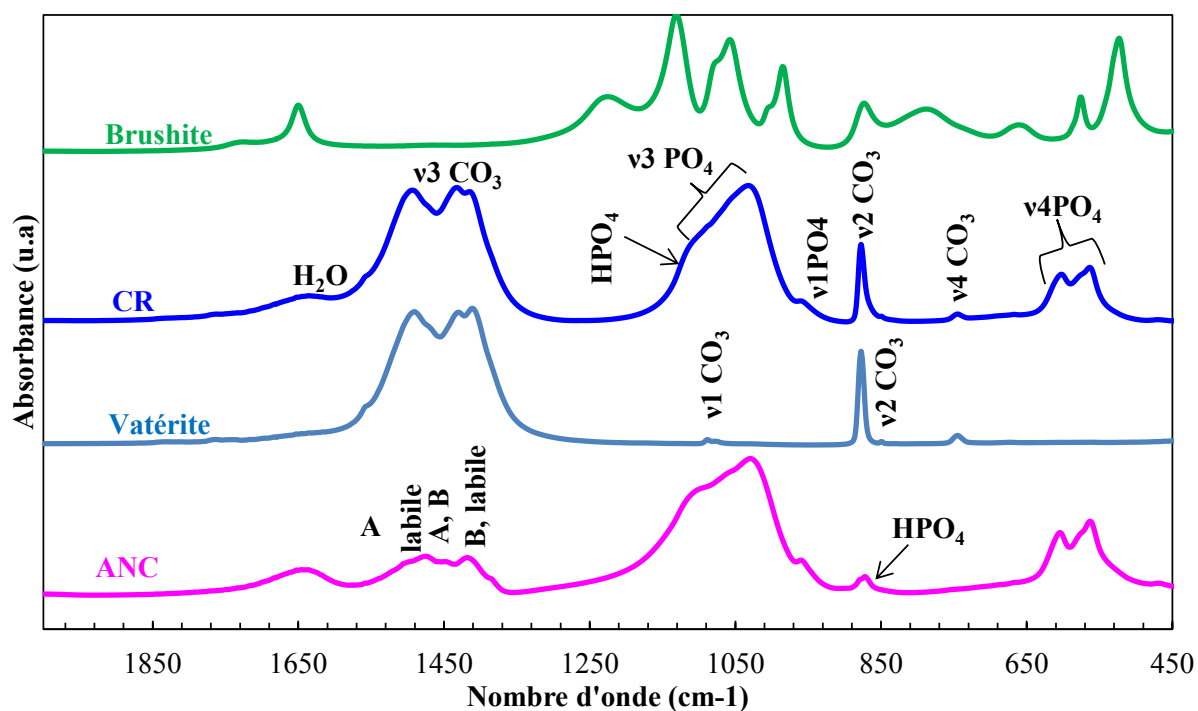


Figure II-14 : Spectres d'absorption infrarouge du ciment de référence (CR), de la vaterite, de la brushite et d'une apatite nanocristalline carbonatée (ANC-15j).

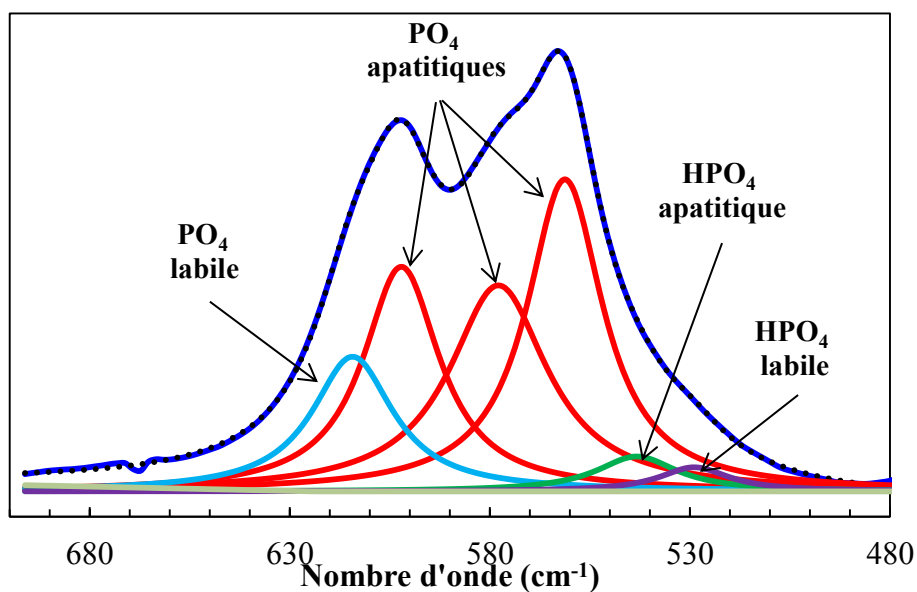


Figure II-15: Exemple de décomposition mathématique de la bande v_4 PO_4 du ciment de référence dans le domaine $480-700\text{ cm}^{-1}$.

Tableau II-5 : Positions et attributions des bandes d'absorption infrarouge du ciment de référence (vatérite (V) et apatite nanocristalline (Ap)).

Position des bandes (cm ⁻¹)	Phase	Attribution des bandes
3400		H ₂ O
1645		H ₂ O
1430, 1403	V	v ₃ CO ₃
1540 1500 1460-1470 1420	Ap	v ₃ CO ₃ type A labile type A et B type B et labile
1144	Ap	HPO ₄
1088, 1078	V	v ₁ CO ₃
1104, 1091, 1072, 1059, 1044, 1031, 1020, 1006	Ap	v ₃ PO ₄
962	Ap	v ₁ PO ₄
876, 849, 831	V	v ₂ CO ₃
880 871 866	Ap	v ₂ CO ₃ type A type B labile
870	Ap	HPO ₄
750-650 745	Ap V	H ₂ O v ₄ CO ₃
633 617 603, 575, 562 551 533 469	Ap	OH PO ₄ labile v ₄ PO ₄ HPO ₄ HPO ₄ labile v ₂ PO ₄

Tableau II-6 : Modèle utilisé pour décomposer le spectre d'absorption infrarouge dans le domaine 480 – 700 cm⁻¹

Bande	Position (cm ⁻¹)	Modèle de la bande
PO ₄ ³⁻ non-apatitique	617	Lorentzienne
PO ₄ ³⁻ apatitique	602	Lorentzienne
PO ₄ ³⁻ apatitique	576	Lorentzienne
PO ₄ ³⁻ apatitique	561	Lorentzienne
HPO ₄ ²⁻ apatitique	550	Lorentzienne
HPO ₄ ²⁻ non-apatitique	532	Lorentzienne

II-2-3- Microscopie électronique à balayage

Les observations par microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur le ciment durci (c'est-à-dire ayant mûri 48 h puis séché 3 jours à 37 °C). La micrographie du ciment de référence montre des pores qui semblent répartis de manière non homogène (figure II-16-(a)). Ces pores présentent une forme assez irrégulière et une taille allant environ de 2 à 100 μm . Cette catégorie de pore est probablement due à un dégagement du dioxyde de carbone (CO_2) au cours de la réaction de prise. Sur des clichés avec des grossissements plus importants (figure II-16-(b)), on note que le ciment présente également des pores avec des tailles inférieure à 2 μm .

Les micrographies obtenues à différents grossissements (figure II-17(c) et (d)) indiquent que l'apatite se forme à la surface des particules sphériques de taille aux alentours de 2 μm correspondant à la taille des particules de vatérite non consommées durant la prise. Dans certains endroits on note des nanocristaux enchevêtrés caractéristiques de l'apatite.

L'analyse par DRX et spectroscopie FTIR montre que la vatérite est toujours présente dans le ciment de référence même après la fin de prise, tandis que les photos MEB ne mettent pas en évidence la présence de particules de vatérite. Ceci pourrait être dû au fait que lors de la réaction de prise de ciment, ces cristaux de vatérite sont recouverts et masqués par ceux de l'apatite formée à leur surface comme décrit dans le paragraphe précédent. On peut remarquer la présence rare de plaquettes de brushite même à la fin de la prise du ciment (figures II-17 (a) et (b)). La plupart du temps, on observe seulement les empreintes laissées par les plaquettes de brushite dissoutes qui n'ont pas eu le temps d'être comblées par de l'apatite formée et ce probablement en raison de la rigidification progressive de la pâte du ciment au cours de la prise.

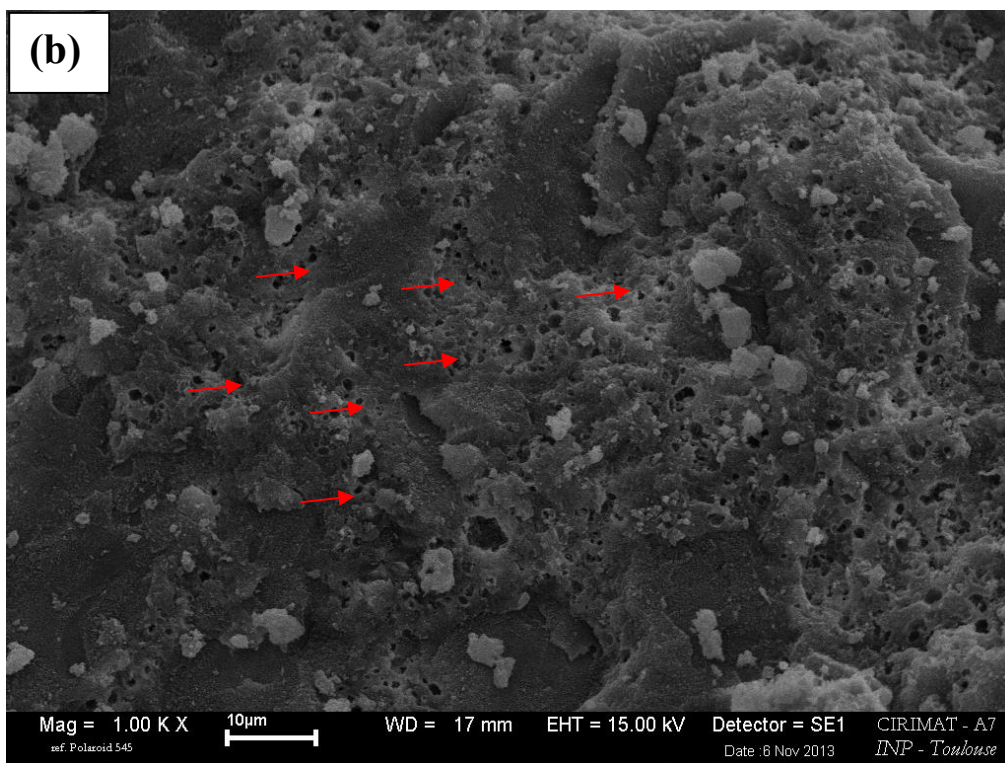
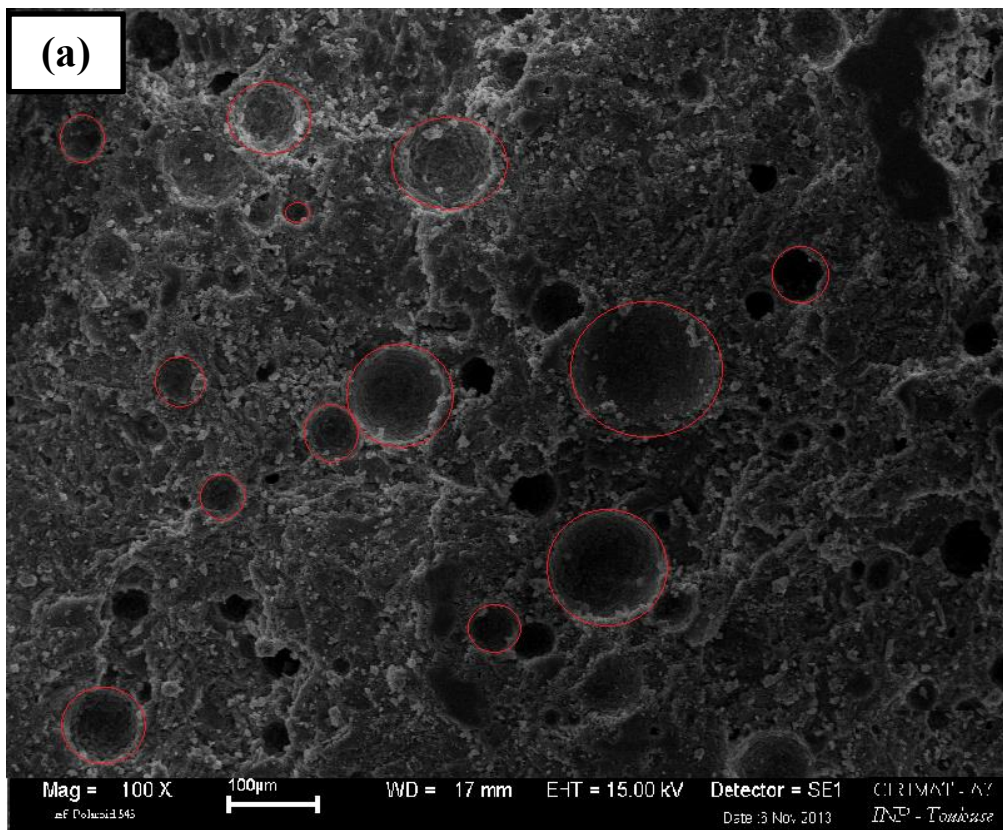


Figure II-16 : Micrographies MEB du ciment de référence après la prise : à faible grossissement (a) et à grand grossissement (b).

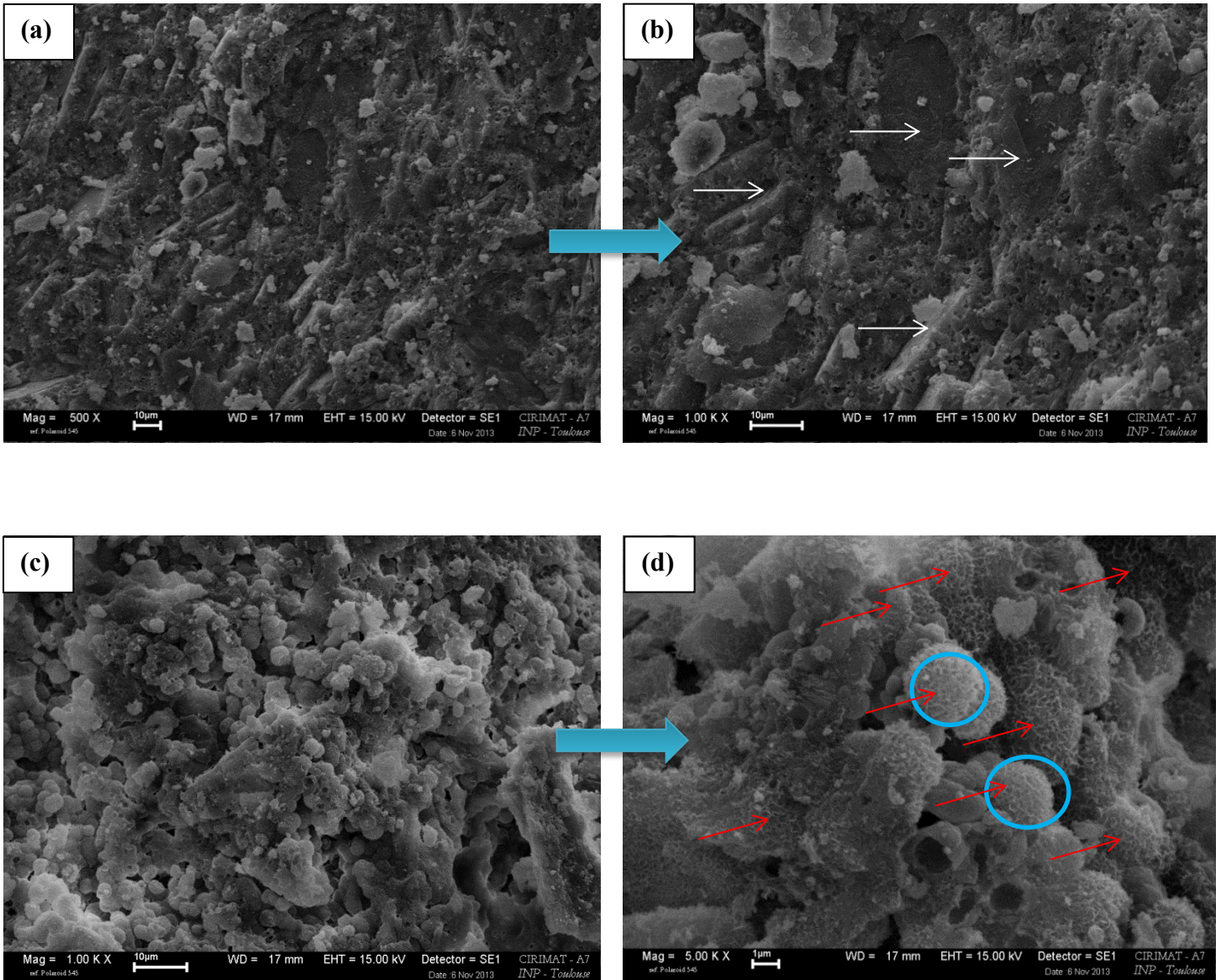


Figure II-17 : Micrographies MEB du ciment de référence à deux grandissements différents : l'apatite et la brushite sont indiquées par des flèches rouges et blanches respectivement, et la vatérite par des cercles bleus.

II-3- Etude de la cinétique de prise du ciment

Dans le but de mieux appréhender la réaction de prise du ciment, nous avons étudié l'évolution de la composition du ciment de référence au cours du temps, pendant la prise et le durcissement.

II-3-1- Protocole

Les échantillons ont été préparés selon le protocole décrit au paragraphe II-1. Une quantité (10 g) de pâte du ciment préparée a été subdivisée en 9 portions ; celles-ci sont ensuite placées dans des récipients fermés et en atmosphère humide dans une étuve à 37°C pendant un temps donné (t_i) compris entre 5 min et 48 h, puis au bout du temps choisi la pâte est séchée par lyophilisation pour éliminer l'eau et ainsi stopper la réaction de prise du ciment.

Les ciments séchés ont été analysés par spectroscopie FTIR et diffraction des rayons X, afin de mieux comprendre la cinétique de prise chimique du ciment et l'évolution de ses caractéristiques physico-chimiques.

II-3-1-1- Analyse par spectroscopie infrarouge

Nous nous intéressons dans cette étude uniquement aux domaines de nombres d'onde compris entre 450 et 850 cm^{-1} , et puis entre 850 et 1300 cm^{-1} , lesquels contiennent les bandes caractéristiques de groupements phosphates de l'apatite (Ap) et de la brushite (B) et les bandes carbonate de la vatérite (V). Les figures II-18 et II-19 présentent l'évolution des spectres d'absorption infrarouge lors de la réaction de prise du ciment, et ce après normalisation⁹ de l'ensemble du spectre et la soustraction de la ligne de base. Le spectre de la pâte obtenue au temps initial ($t = 5$ min) est caractéristique de celui de la phase solide initialement constituée de vatérite et de brushite : on distingue les bandes des groupements phosphates de la brushite ($\nu = 526, 663, 790, 980, \text{ et } 1224 \text{ cm}^{-1}$) et les bandes des groupements carbonates de la vatérite ($\nu = 744 \text{ et } 877 \text{ cm}^{-1}$) ; après ce temps court de maturation de la pâte l'apatite n'est pas encore formée. Sur les spectres obtenus après 2 h d'évolution on observe l'apparition et l'augmentation de l'intensité de trois nouvelles bandes caractéristiques de l'apatite ($\nu = 1030, 602 \text{ et } 562 \text{ cm}^{-1}$), ainsi que la diminution de l'intensité des bandes caractéristiques des réactifs de départ (vatérite et brushite). Le spectre enregistré après 24 h met encore en évidence la présence de la brushite ; celle-ci disparaît complètement après 48 h au dépend de la formation de l'apatite. Il est à noter que des bandes caractéristiques carbonates de la vatérite persistent encore dans le produit final.

⁹ La normalisation n'a certes pas de sens physicochimique mais permet une bonne visualisation de l'évolution des phases

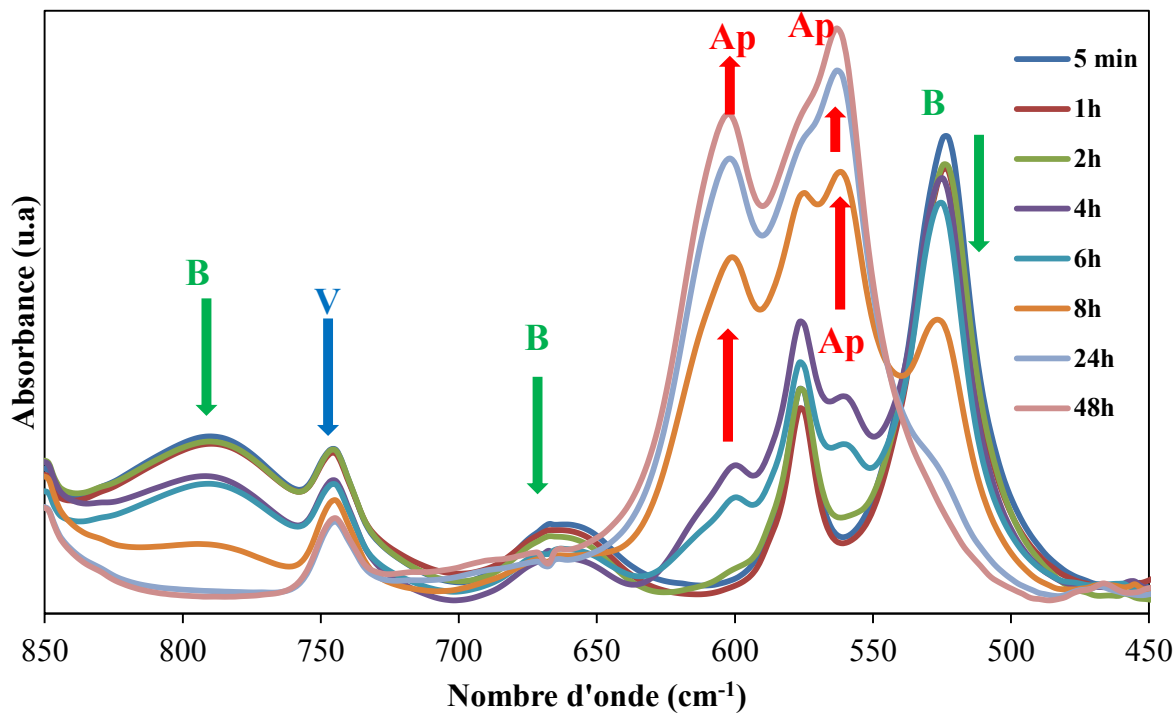


Figure II-18 : Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption infrarouge du ciment de référence dans le domaine (450-850 cm^{-1}).

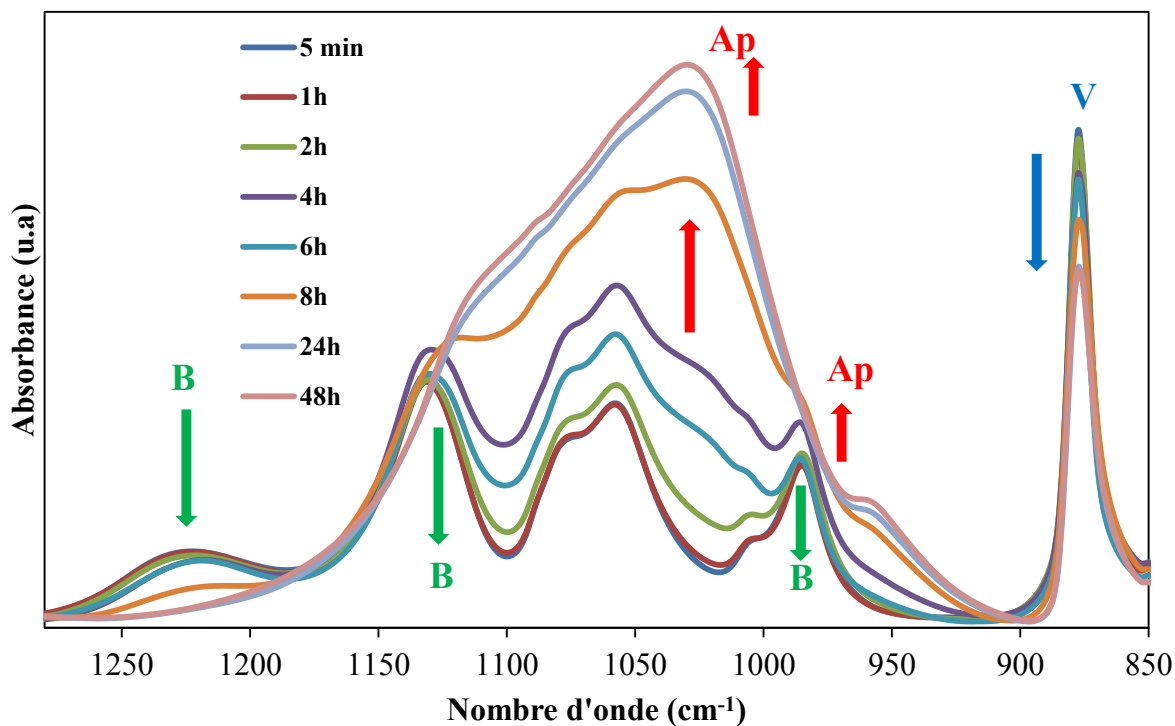


Figure II-19 : Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption infrarouge du ciment de référence dans le domaine 850-1300 cm^{-1} .

Afin de mieux mettre en évidence cette évolution, une quantification relative¹⁰ des différents composés présents dans la pâte du ciment a été réalisée sur la base de l'évolution de l'intensité des bandes à 525,745 et 603 cm⁻¹ respectivement caractéristique de la brushite, la vaterite, et l'apatite. Pour cela nous avons attribué arbitrairement l'intensité maximale à un taux de 100 (% massique) pour chaque composé présent dans la pâte du ciment, soit à 5 min pour la brushite et la vaterite et 48 h de maturation pour l'apatite.

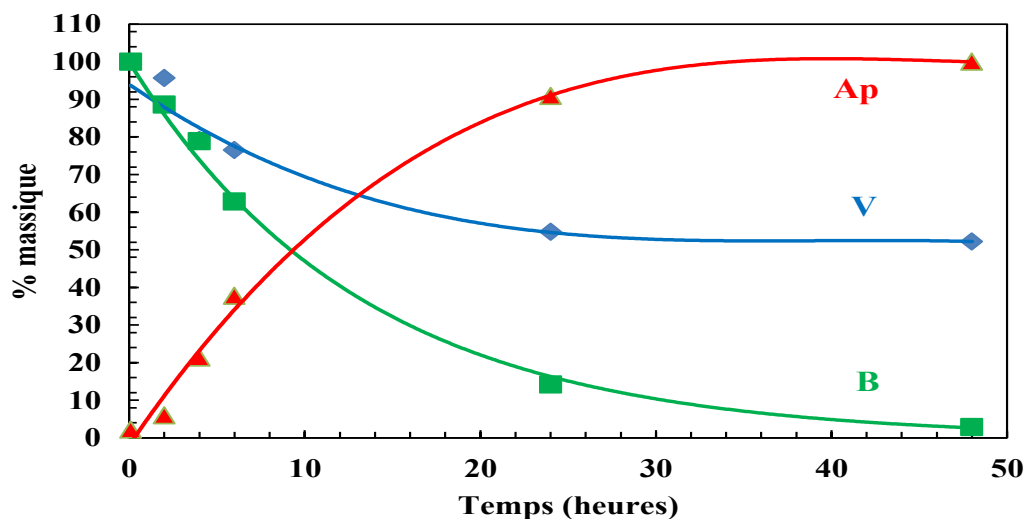


Figure II-20 : Evolution de la quantité relative de brushite (B), vaterite (V) et apatite (Ap) dans le ciment en fonction du temps (évaluation à partir des spectres FTIR).

On note qu'au bout de 48 h de maturation, la brushite a été entièrement consommée (99 %), tandis que le taux de disparition de la vaterite n'excède pas 48 % (figure II-20). Durant les deux premières heures, il y a très peu d'évolution au niveau des quantités de réactifs. La réaction de prise devient rapide entre 2 h et 24 h, comparée au stade initial ; ceci est dû au fait que la dissolution rapide de la brushite rend le milieu plus acide, ce qui facilite par conséquent la dissolution de la vaterite.

II-3-1-2- Analyse par diffraction des rayons X

La figure II-21 montre l'évolution des diagrammes de diffraction des rayons X au fur et à mesure de la réaction de prise du ciment de référence. On remarque la diminution de l'intensité des raies caractéristiques de la vaterite ($2\theta = 21^\circ, 23^\circ$ et 29°) et celle de la brushite ($2\theta = 25^\circ$ et 27°) lors de la maturation de la pâte du ciment, et ce au dépend de la formation de la phase apatitique, caractérisée par l'augmentation de l'intensité des raies de diffraction à $2\theta = 26^\circ$ et 32° . Ces observations sont en accord avec l'analyse faite par spectroscopie FTIR.

¹⁰ La quantification relative déterminée à partir de la normalisation des spectres n'a certes pas de sens physicochimique mais permet une bonne visualisation de l'évolution des phases.

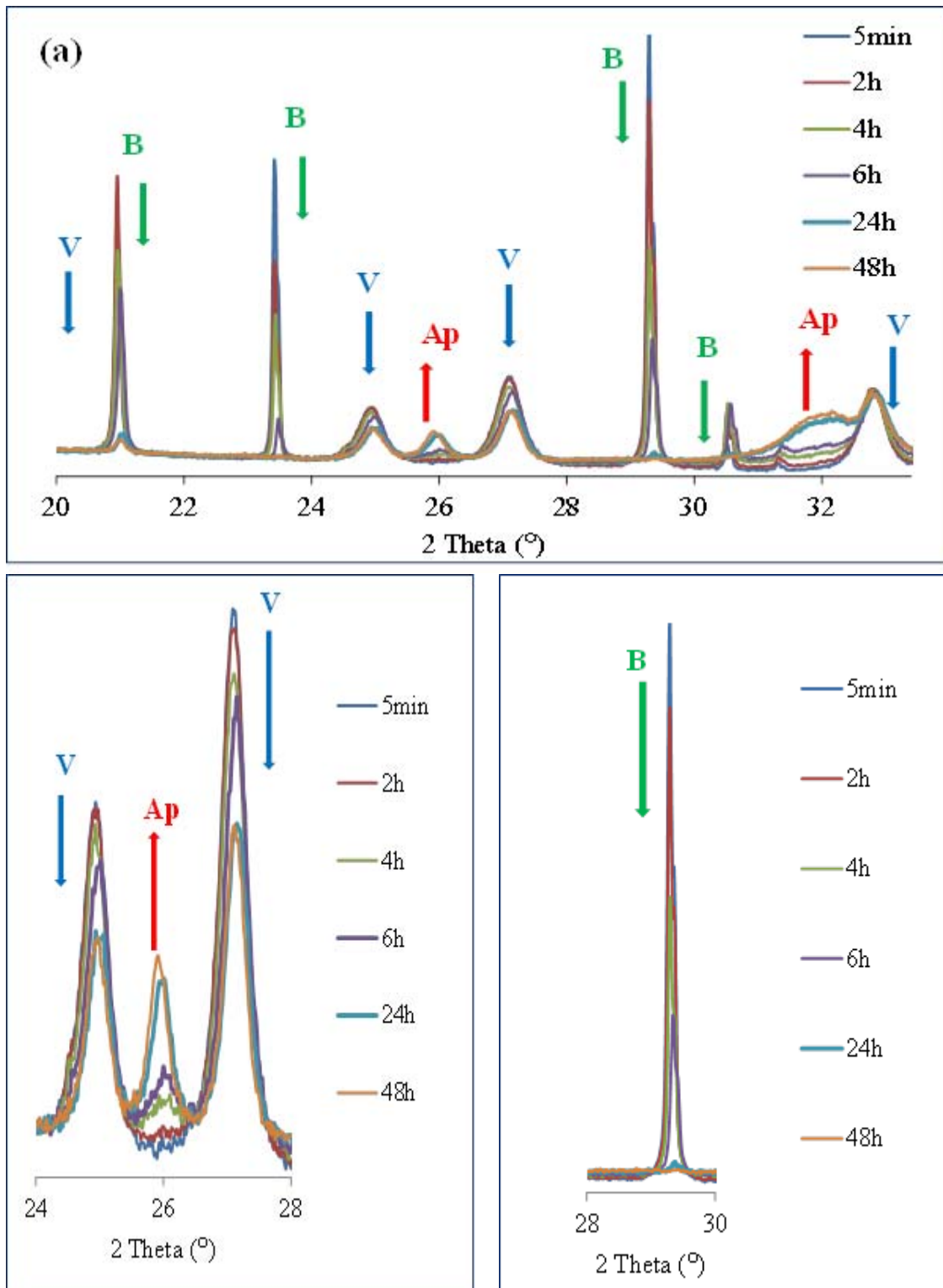


Figure II-21 : Diagrammes de diffraction des rayons X du ciment de référence après différents temps de maturation au cours de la prise (5 min – 48 h) : (a) 2θ de 20 à 34° ;(b) 2θ de 28 à 30° ; (c) 2θ de 24 à 28° .

L'étude comparée de l'évolution des différentes phases (brushite, vatérite et apatite) lors de la réaction de prise du ciment a été réalisée à travers leur quantification relative à partir de l'intensité des raies respectives à $2\theta = 29^\circ$, 25° et 26° . Pour cela, les quantités maximales seront attribuées arbitrairement à un taux massique de 100 % au début de la réaction pour la brushite et la vatérite et à la fin pour l'apatite. Les résultats reportés sur la figure II-22 indiquent qu'après 48 h d'évolution, la brushite a été entièrement consommée (100 %), contre 42 % pour la vatérite. L'étape la plus importante de la réaction de prise se déroule avant 24 h et les teneurs résiduelles en réactifs et celle de l'apatite formée ne semblent pas évoluer de manière significative durant la période de maturation entre 24 h et 48 h.

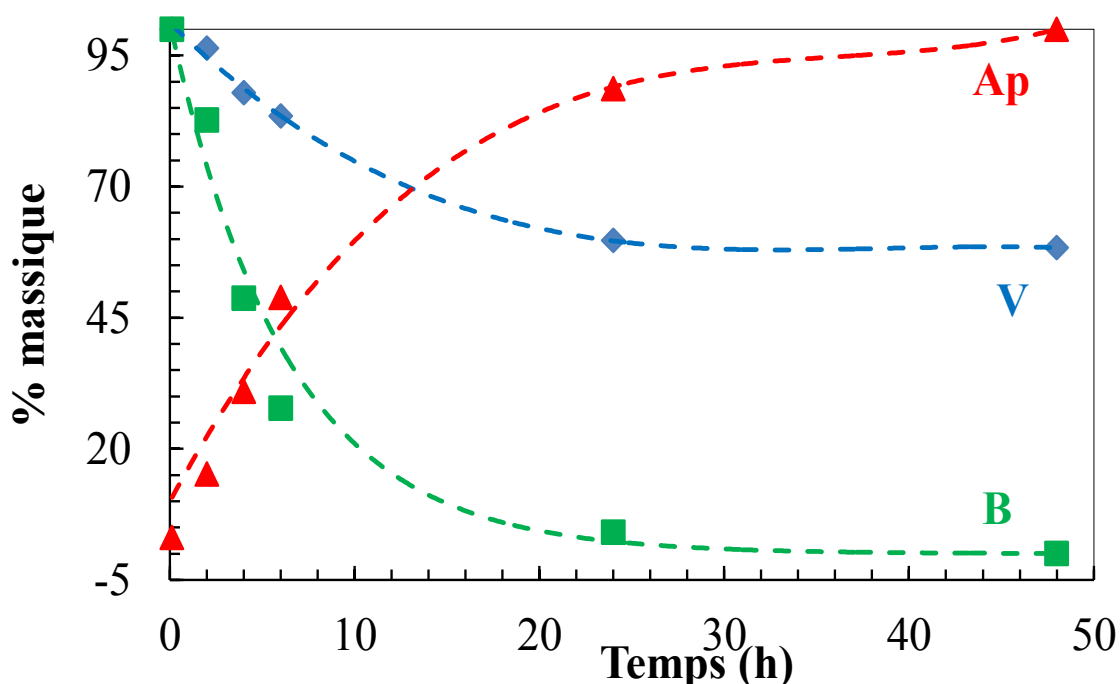


Figure II-22 : Evolution de la quantité relative de brushite, de vatérite et d'apatite au cours de la prise du ciment (évaluation à partir des diagrammes de RX).

L'étude comparée menée par diffraction des RX et spectroscopie FTIR montre (figure II-23) une similitude d'évolution des teneurs relatives de la vatérite et de l'apatite au cours de la prise du ciment; cependant la dissolution de la brushite évaluée par DRX à quatre heures et six heures semble plus rapide comparée à celle évaluée par spectroscopie FTIR.

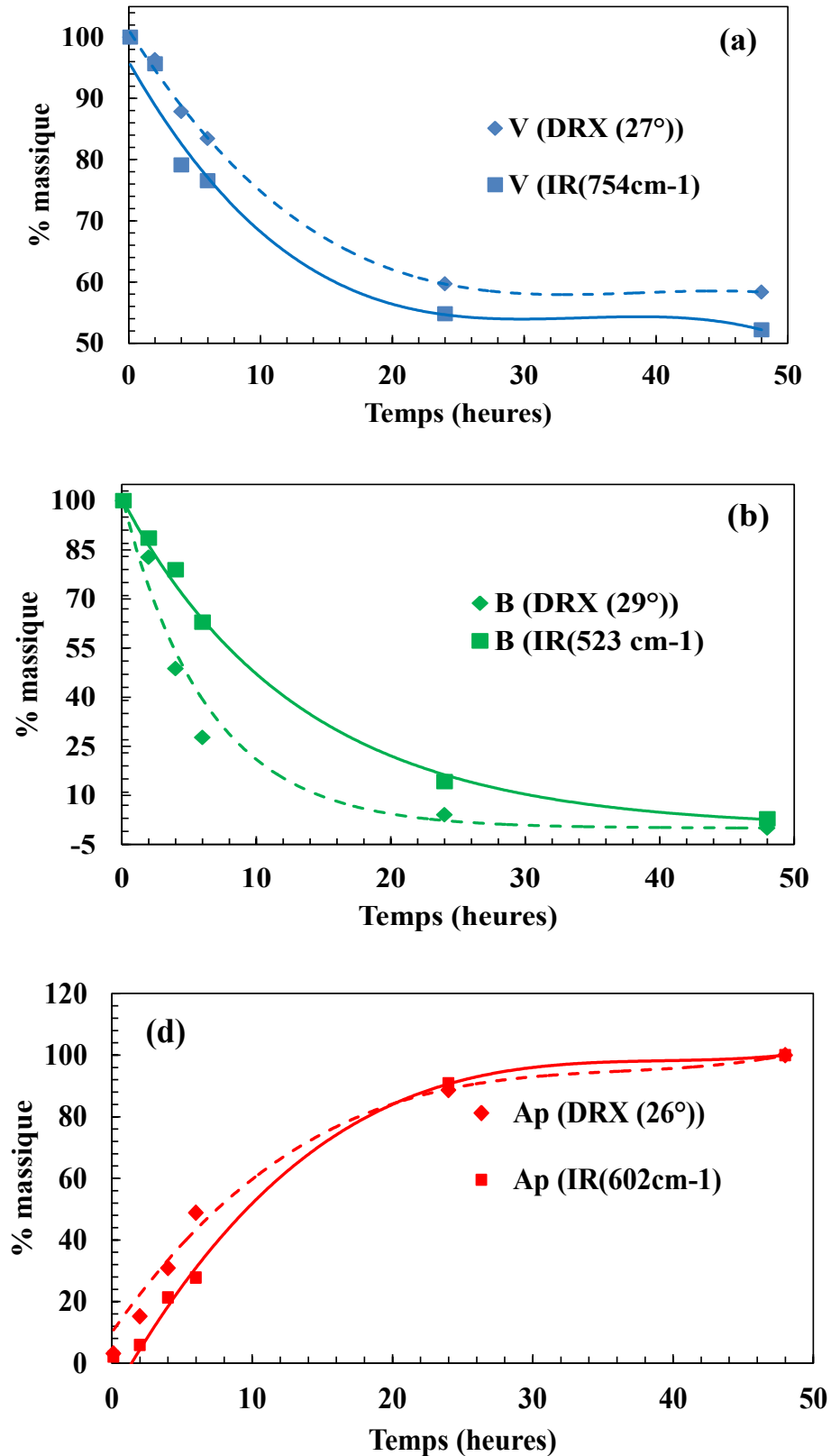


Figure II-23 : Comparaison des résultats des analyses semi-quantitatives obtenues par diffraction des RX et par spectroscopie FTIR pour l'évolution au cours du temps de la composition relative du ciment de référence en vaterite (a), en brushite (b) et en apatite (c).

CONCLUSION

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons synthétisé et précisé les caractéristiques physicochimiques de l'hydroxyapatite et de l'apatite nanocristalline carbonatée, qui serviront de supports pour l'étude d'adsorption qui est présentée dans le chapitre III. L'hydroxyapatite obtenue montre des raies fines et bien résolues ce qui atteste d'un état bien cristallisé ; cependant, les raies larges et mal résolues notées pour l'apatite nanocristalline carbonatée témoignent d'une apatite de basse cristallinité analogue au minéral osseux. L'analyse par DRX et spectroscopie d'absorption IR indique que ces composés sont minéralogiquement purs et exempts de toute phase étrangère autre que l'apatite.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à la caractérisation de la brushite et la vaterite qui sont les poudres réactives nécessaires à l'élaboration du ciment de référence. Les analyses physico-chimiques par DRX et spectroscopie d'absorption IR confirment la pureté des composés synthétisés.

Le ciment de référence a été élaboré à partir d'un mélange équimassique de vaterite et de brushite ; le mécanisme de formation du ciment passe par la dissolution des réactifs suivis d'une précipitation, ce qui conduit à la formation d'une nouvelle phase : l'apatite. L'analyse par DRX, spectroscopie d'absorption IR et MEB confirme que cette nouvelle phase correspond à une apatite carbonatée analogue au minéral osseux.

L'étude de la cinétique de prise du ciment de référence réalisée par une analyse semi-quantitative par spectroscopie d'absorption infrarouge et par DRX montre qu'il est possible de suivre l'évolution de la composition du ciment lors de la prise et de préciser les processus physico-chimiques impliqués lors de la prise de ce ciment. La quantification par ces deux méthodes permet d'évaluer l'évolution de la quantité relative de brushite, de vaterite et d'apatite au sein de la pâte du ciment au cours de sa prise et de son durcissement.

CHAPITRE III

ASSOCIATION DE PHOSPHATE DE CALCIUM AVEC UN ANTIBIOTIQUE : CAS DE L'ACIDE FUSIDIQUE & FUSIDATE DE SODIUM

Ce chapitre est destiné à l'étude de l'association de l'antibiotique avec les phosphates de calcium élaborés ; il est divisé en deux parties. La première porte sur l'interaction du fusidate de sodium avec des apatites de synthèse ; c'est une étape déterminante dans le processus de développement de biomatériaux pour une libération localisée et contrôlée de molécules actives. Les principaux paramètres susceptibles d'affecter la capacité de rétention et de libération du principe actif seront déterminés. Pour cela, les caractéristiques physicochimiques du support (stoechiométrie, index de cristallinité, état de surface, composition chimique) et la concentration de la molécule active ont été prises comme variables expérimentales afin de spécifier le mode d'association de l'antibiotique avec les matériaux examinés.

La seconde partie du chapitre focalise sur la formulation et la caractérisation physicochimique d'un ciment mixte à base de phosphate de calcium et de carbonate de calcium incluant le principe actif. Une attention particulière sera apportée à la mise en lumière des paramètres susceptibles d'affecter les caractéristiques du produit final. Ainsi, l'influence de la voie d'association de l'antibiotique avec le ciment, la dose de l'antibiotique et la quantité d'eau nécessaire pour l'élaboration du ciment (rapport Liquide/Solide) sur les caractéristiques du système préparé ont été examinées. La prise en considération de ces facteurs permet de mieux contrôler l'aptitude du ciment à l'association et également à la libération du principe actif pour la conception d'un système à délivrance locale et prolongée d'un antibiotique.

PARTIE A
ETUDE PRELIMINAIRE DE
L'INTERACTION ENTRE APATITES ET
FUSIDATE DE SODIUM

INTRODUCTION

L'interaction entre phosphates de calcium apatitiques et molécules biologiquement actives a fait l'objet de nombreux travaux en raison de leur importance dans le domaine biomédical. Les études d'adsorption effectuées ces dernières années concernent principalement des acides aminés [Misra, 1997, Benaziz et al., 2001, El Rhilassi et al., 2012], des protéines [Barroug et al., 2008; Ouizat et al., 1999 ; Kandori et al., 2011] des agents anticancéreux [Barroug et al., 2004; Lebugle et al., 2002] et des bisphosphonates [Nancollas et al. 2006, Pascaud et al., 2014 ; Errassifi et al., 2014]. Toutefois, les investigations engagées sur l'association en solution d'antibiotiques et d'apatites sont rares [Ginebra et al., 2012; Cazalbou et al., 2015 ; Baradari et al., 2012] et ne semblent fournir des données précises sur la nature physicochimique du processus d'interaction de ces molécules avec des substrats apatitiques. Dans cette perspective, nous nous proposons d'étudier le processus d'adsorption du fusidate de sodium par des apatites de synthèse. Il s'agit de l'hydroxyapatite, matériau bien cristallisé largement utilisé pour l'élaboration de biocéramiques; cependant ce matériau reste assez éloigné de la composition et de la nature réelle du minéral des tissus calcifiés et de leurs propriétés [Rey, 1990]. Ainsi, complémentairement nous avons examiné la réactivité d'une apatite nanocristalline carbonatée de basse cristallinité qui s'apparente le mieux au minéral osseux ainsi qu'à l'apatite formée au cours de la prise du ciment que nous étudions dans ce travail de thèse; les nanocristaux de ces apatites nanocristallines sont dotés à leur surface d'une couche hydratée très réactive et riche en ions labiles positionnés dans des « environnements non apatitiques ». Parallèlement, l'interaction du fusidate avec un ciment préparé à base de phosphate et de carbonate de calcium et destiné à jouer le rôle de support pour la délivrance de l'antibiotique a également été étudiée.

Cette étude vise à mieux connaître la nature physicochimique du processus d'interaction (phénomènes d'adsorption/désorption) du fusidate avec les apatites biologiques ainsi que celle constituant le ciment étudié. Pour cela, les caractéristiques du solide et de la solution ont été prises comme variables expérimentales. L'évaluation de la capacité de rétention des matériaux apatitiques sera d'un apport pour la compréhension des phénomènes qui interviennent lors de l'association du principe actif avec le biomatériau et de sa libération *in vitro* et *in vivo*.

I- Caractérisation de l'acide fusidique et du fusidate de sodium

Des analyses physicochimiques ont été menées sur l'acide fusidique et le fusidate de sodium afin de mieux caractériser ce principe actif et ainsi aider à l'interprétation et à la compréhension de son mode d'interaction avec les apatites synthétisées dans la perspective d'un contrôle de la libération de ce principe actif *in vivo*.

I-1- Spectroscopie infrarouge

La figure III-2 présente les spectres d'absorption infrarouge de l'acide fusidique ainsi que celui du fusidate de sodium. Les attributions ainsi que les intensités relatives des bandes de vibration observées sont consignées dans le tableau III-1.

L'identification des bandes du spectre IR de l'acide fusidique nécessite un dépouillement minutieux de celui-ci ; nous avons essayé d'examiner quelques bandes correspondant à la région $4000-1500\text{ cm}^{-1}$ qui contient essentiellement des bandes d'élongation ainsi que de déformation qui se trouvent dans la région $1500-900\text{ cm}^{-1}$ et qui correspondent aux fonctions principales de la molécule.

La première région montre bien l'existence des groupements carbonyles qui est justifiée par la présence d'une bande d'élongation intense et très large à 3560 cm^{-1} ainsi qu'une absorption intense à 1723 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation de la fonction acide (figure III-2 (a) et (b)) ; cette absorption devrait normalement être comprise entre 1800 et 1740 cm^{-1} , ce qui met en évidence la conjugaison de cette fonction avec un alcène. Un pic large et moyennement intense à 3026 cm^{-1} indique la présence d'alcènes ; d'après la formule chimique du composé, les deux alcènes présents ne sont pas conjugués entre eux par contre l'un d'eux est conjugué avec la fonction acide. L'autre bande à 2952 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation de la fonction acide.

La présence d'ester est confirmée par une forte absorption entre 1750 et 1730 cm^{-1} puis entre 1300 et 1050 cm^{-1} ; dans notre cas la fonction ester absorbe à 1748 et à 1262 cm^{-1} , c'est à dire à deux valeurs de nombre d'onde assez élevées qui confirment la non conjugaison de celui-ci.

Les principales bandes de vibration caractéristiques de l'acide fusidique sont reportées dans le tableau III-1.

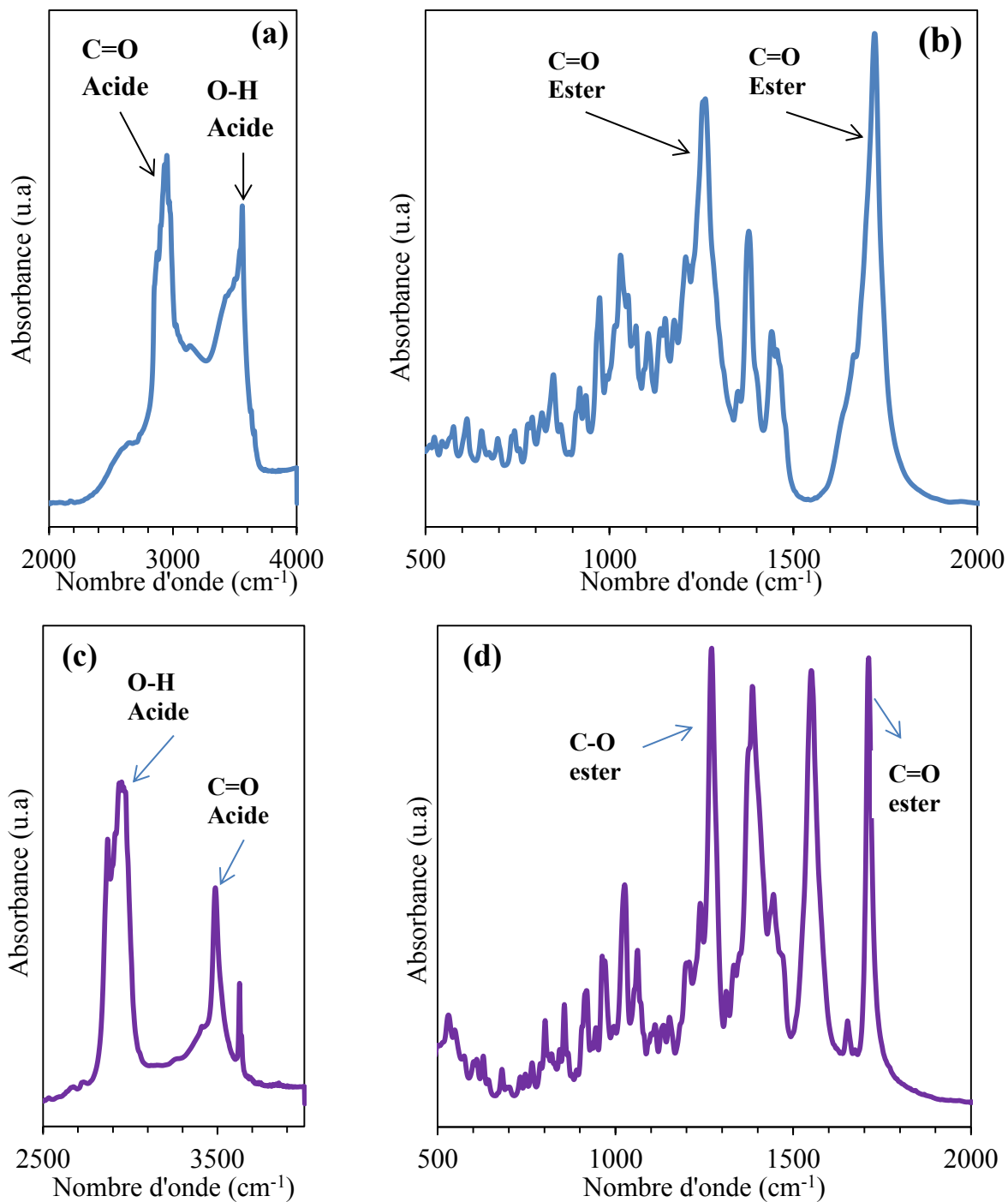


Figure III-2 : Spectres d'absorption infrarouge de l'acide fusidique (domaines : (a) 4000 – 2500 cm⁻¹ et (b) 2000 – 500 cm⁻¹) et du fusidate de sodium (domaines : (c) 4000 – 2000 cm⁻¹ et (d) 2000 – 500 cm⁻¹).

Tableau III-1 : Positions et attributions des bandes d'absorption infrarouge de l'acide fusidique.

Position des bandes (cm ⁻¹)	Intensité des bandes	Attribution des bandes
3650	<i>moyenne</i>	vO-H H ₂ O
3628	<i>intense et large</i>	vO-H Alcool secondaire
3560	<i>intense et large</i>	vO-H Fonction acide
3026	<i>moyenne</i>	vC-H Alcène di-substituée Z
2973	<i>moyenne</i>	vC-H symétrique, Alcène
2952	<i>intense</i>	vCH ₃ -(C=O), Fonction carboxylique
2927	<i>forte</i>	vC-H asymétrique (-CH ₂ -)
2870	<i>faible</i>	vC-H Alcane
2846	<i>forte</i>	vC-H symétrique (-CH ₂ -)
1748 1738	<i>forte</i>	vC=O Ester aliphatique
1723 1719	<i>forte</i>	vC=O Fonction acide
1479	<i>faible</i>	Cisaillement δC-H (-CH ₂ -)
1464	<i>moyenne</i>	δC-H asymétrique (-CH ₃)
1448 1440	<i>moyenne</i>	vC=O CH ₃ -(C=O)
1375	<i>plus forte que celle des hydrocarbures</i>	CH ₃ -(C=O) vC=O
1349	<i>faible</i>	δC-H Alcène, di-substituée Z
1300 1152	<i>faible</i>	vC-O Alcool secondaire
1262	<i>forte</i>	vC-O Ester
1176	<i>forte</i>	vC-O Acide
1108	<i>faible</i>	δC-O Alcool secondaire
973	<i>faible</i>	δC-H Alcène trans

I-2- Méthode de dosage de l'antibiotique

Il existe plusieurs méthodes pour la quantification de l'acide fusidique ou du fusidate de sodium en solution ; à titre d'exemple on cite la titrimétrie, la chromatographie liquide à haute performance, la spectrophotométrie dans l'ultraviolet ou le visible.

Généralement l'acide fusidique et le fusidate de sodium présentent une absorbance maximale à 210 nm et un épaulement entre 220 et 240 nm (figure III-5). La procédure de quantification de ces molécules par spectrométrie UV a été présentée dans la littérature [Hassan et al., 1987]. La méthode proposée met en évidence l'épaulement à environ 228 nm en utilisant la technique de la dérivée première, et démontre la possibilité de doser avec succès les concentrations de plusieurs formes pharmaceutiques. Dans le cadre de notre travail, nous avons opté pour la spectrophotométrie dans l'ultraviolet en raison de sa sensibilité, sa reproductibilité et sa simplicité.

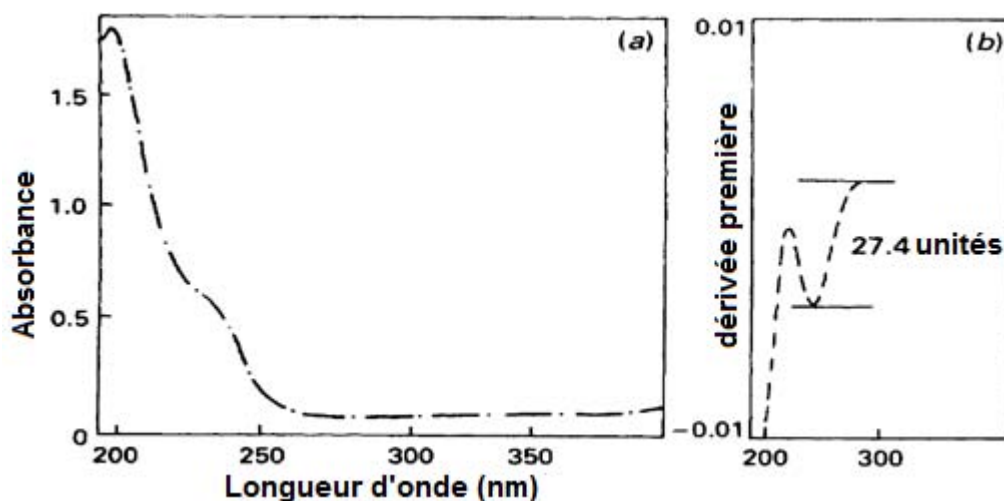


Figure III-5 : Spectre d'absorption dans l'UV de l'acide fusidique à une concentration de 2 mg/100 mL dans un tampon borate à pH 8,6 [Hassan et al., 1987].

I-3- Validation de la méthode de dosage

Afin de valider la méthode de dosage proposée et de l'adapter à nos conditions, nous avons cherché à examiner l'effet éventuel des électrolytes présents dans le milieu d'adsorption sur l'absorbance de l'antibiotique. Pour cela, nous avons mesuré l'absorbance du fusidate de sodium solubilisé dans une solution de chlorure de potassium (KCl, 1 mM) en présence et en absence d'ions susceptibles d'interférer avec la molécule.

Les solutions utilisées dans notre étude sont fraîchement préparées; elles ont été obtenues en dissolvant 30 mg de fusidate de sodium dans une solution standard de KCl (1 mM) ou dans le même milieu contenant soit du chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1 à 5 mM), du phosphate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 1 à 5 mM), ou de carbonate de potassium (K_2CO_3 : 1 à 5 mM), et ce pour évaluer l'éventuel effet respectivement de la présence d'ions

calcium, phosphate ou carbonate dans la solution sachant que ce sont les principaux constituants des ciments chargés en antibiotique que nous allons étudier (chapitre III - B).

La figure III-6 présente les spectres d'absorbance UV du fusidate de sodium en présence de teneurs variables de sels de carbonate (a), de calcium (b) et de phosphate (c). Comme on peut le voir, l'absorbance de la solution de fusidate dans le domaine 200 - 228 nm est sensible à la nature de l'électrolyte, traduisant ainsi l'existence d'une interférence entre le fusidate et les espèces présentes en solution. Cependant, les solutions électrolytiques ne semblent pas altérer l'absorbance du fusidate vers 235 nm, ce qui met en évidence l'intérêt de réaliser le dosage à cette longueur d'onde. Par ailleurs, nous avons vérifié que l'absorbance à 235 nm dans les diverses conditions examinées reste bien inchangée même après quelques jours à température ambiante.

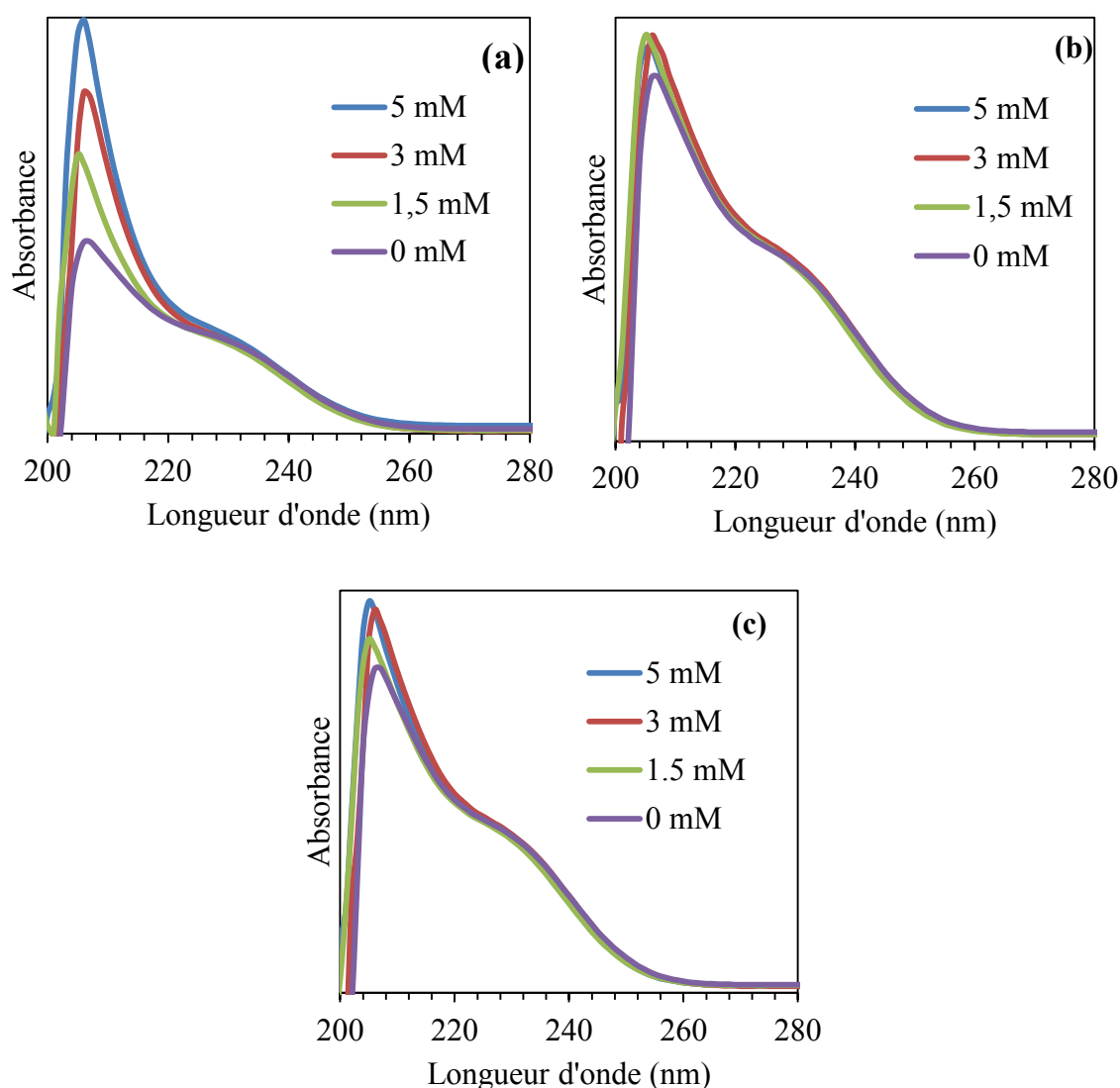


Figure III-6: Spectres d'absorption du fusidate de sodium à une concentration de 30 mg/L dans une solution de NaCl à 0,9 % (m/m) en présence de teneurs variables de sels de carbonate K_2CO_3 (a), de calcium $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (b) et de phosphate $(NH_4)_2HPO_4$ (c).

II- ETUDE DE L'ADSORPTION DU FUSIDATE SUR DES SUPPORTS APATITIQUES

II-1- Matériaux et méthodes

II-1-1- Protocole expérimental

Les tests d'adsorption ont été réalisés par le suivi de la concentration de fusidate de sodium dans la solution. Les adsorbants utilisés dans cette étude sont l'hydroxyapatite (HA), l'apatite nanocristalline carbonatée (ANC) et le ciment de référence (CR) dont la préparation a été décrite au chapitre II; ils se présentent tous sous forme de poudre. Ces supports ont subi un tamisage à 100 μm de manière à éliminer les plus gros agglomérats en vue d'une adsorption de principe actif mieux contrôlée et plus répétable. Les différentes caractéristiques physicochimiques de ces matériaux ont fait l'objet du deuxième chapitre de ce manuscrit.

II-1-2- Etude d'adsorption

Les solutions utilisées comme milieu d'adsorption sont fraîchement préparées; elles ont été obtenues en dissolvant la quantité appropriée de fusidate de sodium dans une solution standard de chlorure de potassium (KCl, 1 mM) ou dans le même milieu contenant du phosphate de potassium (KH_2PO_4 ; 0-5 mM) ou du carbonate de potassium (K_2CO_3 ; 0-5mM). Le pH des solutions d'adsorbat ($\text{pH}_{\text{initial}}$) a été ajusté à la valeur désirée par addition d'une solution de KOH (0,05 M).

L'influence des ions phosphate et carbonate ajoutés dans les solutions d' adsorption sur la fixation du fusidate par l' apatite a été examinée. La force ionique du milieu a été maintenue constante et proche de 11 mM ; cette valeur a été fixée par la solution la plus concentrée en phosphate (5 mM). Pour les autres solutions, une quantité appropriée de KCl a été ajoutée pour atteindre une valeur de force ionique égale à 11 mM.

La démarche adoptée pour nos tests d'adsorption repose sur des expériences réalisées en conditions statiques, sous forme de tests en «batch». Le dénominateur commun de ces tests est la mise en suspension des poudres d'apatites (50 mg) dans des tubes de centrifugation en polyéthylène de contenance 10 mL, avec 5 mL de solution d'adsorption. Les suspensions ainsi obtenues sont placées dans un bain à ultrasons durant quelques minutes afin de désagglomérer les particules de poudre et ainsi favoriser l'interaction de la poudre avec la solution. Ensuite, ces tubes sont mis à incuber dans une étuve pendant 3 h à température physiologique ($T = 37^\circ\text{C}$) sans agitation, en position couchée afin d'optimiser la surface de contact liquide/solide. Une fois l'incubation réalisée, les suspensions sont centrifugées durant 10 min à 4000 tr/min puis filtrées sur filtre Millipore (0,2 μm). Les mesures du pH d'équilibre ($\text{pH}_{\text{équilibre}}$ ou $\text{pH}_{\text{adsorption}}$) ont été réalisées sur les surnageants obtenus après les tests d'adsorption.

Dans tous les cas, des témoins contenant seulement la solution de fusidate ont été traités dans les mêmes conditions que les expériences d'adsorption, afin de tenir compte de toute

éventuelle fixation d'adsorbat sur les parois des tubes utilisés. Nous avons conclu qu'aucune adsorption du fusidate ne se produit sur les parois des tubes.

La teneur en fusidate dans les milieux après adsorption a été mesurée par spectrophotométrie UV à 235 nm. Dans chaque cas, une courbe d'étalonnage a été établie dans la gamme de concentrations explorée afin de déterminer la teneur en antibiotique dans les solutions d'adsorption.

Le taux d'adsorption (Ads (%)) a été calculé à partir de l'équation suivante :

$$\text{Ads (\%)} = [(C_o - C_{\text{éq}})/C_o] \times 100$$

La quantité de fusidate adsorbée (Q_{ads}) a été déterminée par différence entre la concentration initiale de la solution d'adsorbat (C_o) et celle obtenue à l'équilibre ($C_{\text{éq}}$) à l'aide de la formule :

$$Q_{\text{ads}} = (C_o - C_{\text{éq}}) \times V/m$$

où V désigne le volume de la solution utilisée (L) et m la masse de l'adsorbant (g). La quantité adsorbée Q est rapportée à l'unité de masse du support apatitique.

Des tests d'adsorption ont été réalisés plusieurs fois (3 fois) afin d'estimer l'incertitude sur la quantité d'adsorbat fixée à la surface du support. La reproductibilité de nos observations expérimentales a été estimée à environ 5 %.

II-2- Résultats

II-2-1- Etude de la cinétique d'adsorption

L'étude de la cinétique d'adsorption du fusidate par les poudres synthétisées a été réalisée afin de pouvoir déterminer le temps d'incubation optimal au-delà duquel la quantité de fusidate adsorbée reste maximale et constante (équilibre adsorbant-adsorbat). La durée de contact adsorbant-adsorbat nécessaire pour atteindre l'équilibre a été déterminée avec une concentration initiale en adsorbat de $3,7 \cdot 10^{-2}$ mM. L'évolution de la quantité de fusidate adsorbée a été reportée en fonction de la durée d'incubation (Figure III-7). Les résultats obtenus indiquent que la cinétique d'adsorption est très rapide et qu'une durée d'environ 30 min de contact est suffisante pour atteindre l'équilibre avec les trois supports apatitiques dans les conditions examinées. Nous avons vérifié par ailleurs que la quantité de fusidate fixée reste inchangée même après 24 h contact. Pour la suite de notre étude, nous avons opté pour une durée de contact de 3 h, temps largement suffisant pour atteindre l'équilibre.

De plus, nous observons que les caractéristiques physicochimiques du support apatitique semblent avoir une influence sur la capacité d'adsorption du matériau ; la quantité adsorbée par unité de masse classée par ordre décroissant est la suivante : ANC > HA > CR. Cette différence de comportement des matériaux examinés sera discutée dans le paragraphe relatif aux isothermes d'adsorption (II-3).

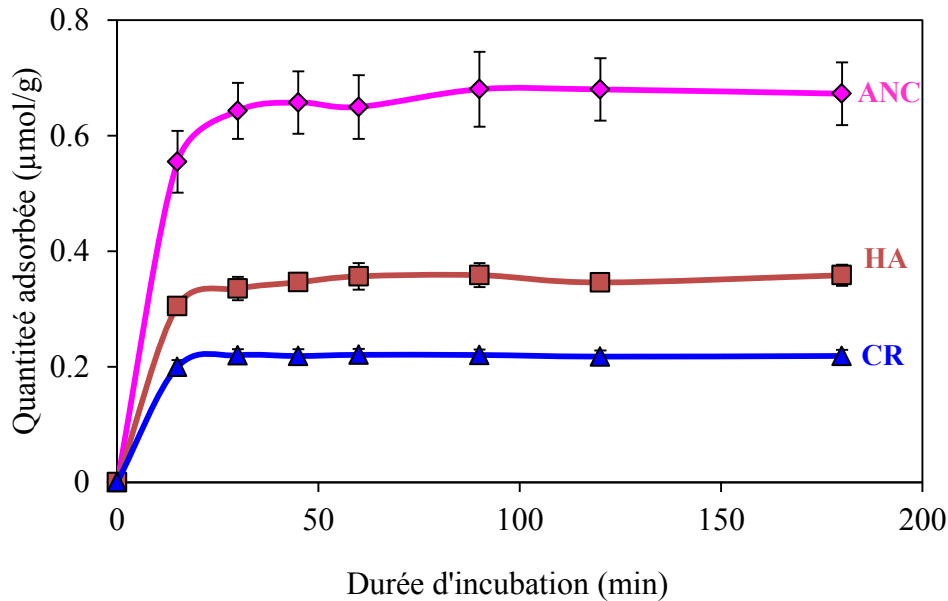


Figure III-7: Cinétique d'adsorption du fusidate de sodium dans un milieu KCl (1 mM) par l'apatite nanocristalline carbonatée (ANC), l'hydroxyapatite (HA) et le ciment de référence (CR).

II-2-2- Isotherme d'adsorption

Les tests d'adsorption ont été menés à température voisine de 37°C avec des solutions de fusidate ayant une concentration couvrant la gamme de 0 à 0,21 mM. Les valeurs initiales de pH des solutions d'adsorption ont été ajustées à 7,8 pour ANC, à 9,0 pour HA, et ce afin d'avoir des suspensions d'adsorption ayant un pH autour de 7,4 à l'équilibre. Pour le ciment de référence (CR), le pH initial des solutions d'adsorption est proche de 7,4 ; nous n'avons pas acidifié ces solutions ($\text{pH} < 7$) afin d'éviter toute éventuelle précipitation du fusidate de sodium en acide fusidique.

Après une durée de contact de trois d'heures, les valeurs de pH des surnageants obtenus après adsorption avoisinent 7,2 pour l'ANC et HA et 8,4 pour CR. Celles-ci sont similaires à celle des supports pré-équilibrés avec la solution d'adsorption ne contenant pas d'antibiotique ; ce qui laisse penser que la fixation de l'antibiotique n'affecte pas le pH du milieu. Toutefois, on note une légère variation de pH pour les différentes suspensions durant la première période de l'incubation et une stabilisation des systèmes pour le reste du traitement (Figure III-8).

Les données d'adsorption obtenues dans les conditions examinées pour les trois supports sont reportées dans le tableau III-2. Nous désignerons par C_0 et $C_{\text{éq}}$ respectivement la concentration d'adsorbant à l'état initial et celle à l'équilibre ($C_{\text{éq}}$) ; Q_{ads} correspond à la quantité de fusidate fixée par le support à l'équilibre et Ads (%) au pourcentage d'adsorption correspondant. Un premier examen des résultats obtenus montre que dans la gamme de concentrations examinée, les supports étudiés présentent une capacité d'adsorption assez faible vis-à-vis des molécules de fusidate. En effet, pour de faibles concentrations en adsorbant

(inférieures à 0,01 mM), le pourcentage d'adsorption maximum n'excède pas 11 %. Ce taux se situe dans la gamme 5-11 % pour l'apatite nanocristalline carbonatée; il est de 4 à 9% pour l'hydroxyapatite et de 3 à 9% pour le ciment de référence.

L'évolution de la quantité de fusidate (Q) retenue par les trois supports en fonction de leur concentration à l'équilibre est représentée dans la figure III-9. Comme on peut le noter, la quantité de molécules de fusidate fixées par les supports examinés croît avec la concentration résiduelle en solution et aucun plateau de saturation n'est observé dans toute la gamme de concentrations examinée.

L'allure des isothermes d'adsorption ainsi obtenues pour les trois supports est de type Freundlich. Cette observation traduit l'existence d'une affinité adsorbant-adsorbat et se caractérise par une capacité de rétention des matériaux assez faibles.

L'évolution linéaire notée pour le fusidate est caractéristique d'une isotherme de type Freundlich ; celle-ci est définie par l'équation :

$$Q = a \cdot C^m$$

la grandeur **Q** représente la quantité adsorbée ($\mu\text{mol/g}$), **C** la concentration à l'équilibre (mmol/L); le paramètre **a** (mL/g) représente la constante d'affinité de l'adsorbat pour la surface de l'adsorbant et **m** une constante du système.

Les paramètres caractéristiques de l'adsorption de l'antibiotique ont été déterminés à partir de l'équation correspondante linéarisée comme suit :

$$\log Q = \log a + m \cdot \log C$$

Le tracé des isothermes d'adsorption de Freundlich sous formes linéarisées pour chacun des supports est présenté sur la figure III-10. Les valeurs des coefficients de corrélation calculés dans tous les cas examinés se situent entre 95 et 99 %. Ainsi, l'obtention d'une droite atteste de la validité du modèle de Freundlich pour rendre compte de l'adsorption du fusidate sur les différents supports apatitiques étudiés.

Les paramètres d'adsorption (**a** et **m**) obtenus pour les trois supports étudiés sont répertoriés dans le tableau III-3. D'après ces résultats on note que la valeur de **m** est inférieure à un et reste proche de l'unité dans tous les cas. La valeur de la constante d'affinité (**a**) montre que l'affinité des apatites pour les molécules d'adsorbat, classée par ordre décroissant, est la suivante : $\text{ANC} > \text{HA} > \text{CR}$.

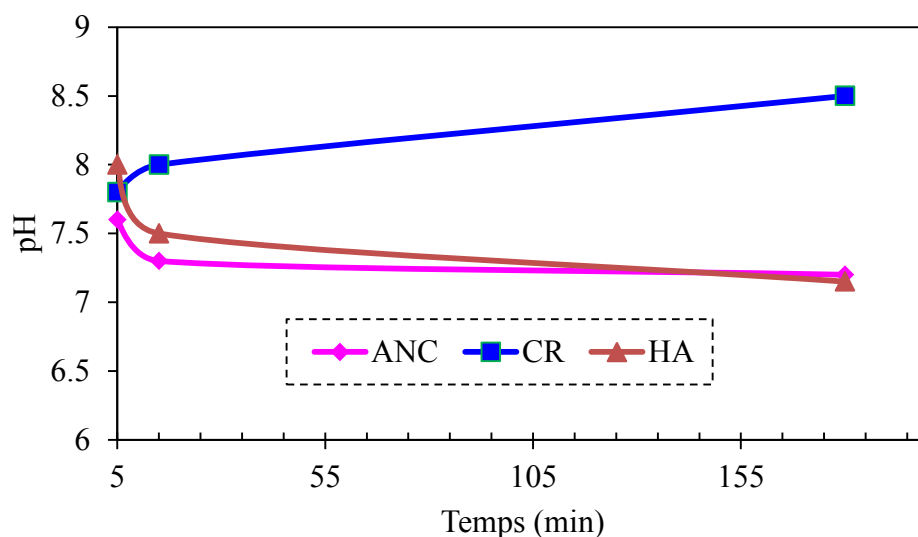


Figure III-8 : Evolution du pH des suspensions d'adsorption en fonction du temps d'incubation pour les supports apatitiques étudiés.

Tableau III-2 : Données d'adsorption du fusidate à 37 °C par les supports apatitiques synthétisés : concentration initiale (C_o) et concentration à l'équilibre ($C_{\text{éq}}$), quantité fixée (Q_{ads}) et pourcentage d'adsorption (Ads (%)).

ANC				C_o (mM)	HA			CR		
C_o (mM)	$C_{\text{éq}}$ (mM)	Q_{ads} ($\mu\text{mol/g}$)	Ads (%)		$C_{\text{éq}}$ (mM)	Q_{ads} ($\mu\text{mol/g}$)	Ads (%)	$C_{\text{éq}}$ (mM)	Q_{ads} ($\mu\text{mol/g}$)	Ads (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0111	0,0103	0,078	11,14	0,0093	0,0084	0,083	9,26	0,008	0,083	9,34
0,0232	0,0207	0,246	10,74	0,0186	0,0175	0,106	8,73	0,017	0,098	7,57
0,0464	0,0426	0,375	8,11	0,0371	0,0352	0,191	7,90	0,035	0,180	5,81
0,0649	0,0601	0,484	7,49	0,0743	0,0710	0,321	5,96	0,071	0,300	4,92
0,0928	0,0865	0,630	6,80	0,1114	0,1068	0,582	5,50	0,107	0,460	4,14
0,1392	0,1320	0,854	5,18	0,1485	0,1411	0,737	4,99	0,143	0,560	3,82
0,1671	0,1572	1,046	5,93	0,1670	0,1590	0,812	4,79	0,161	0,610	3,72
0,1856	0,1728	1,075	5,57	0,1856	0,1768	0,863	5,41	0,180	0,740	3,09

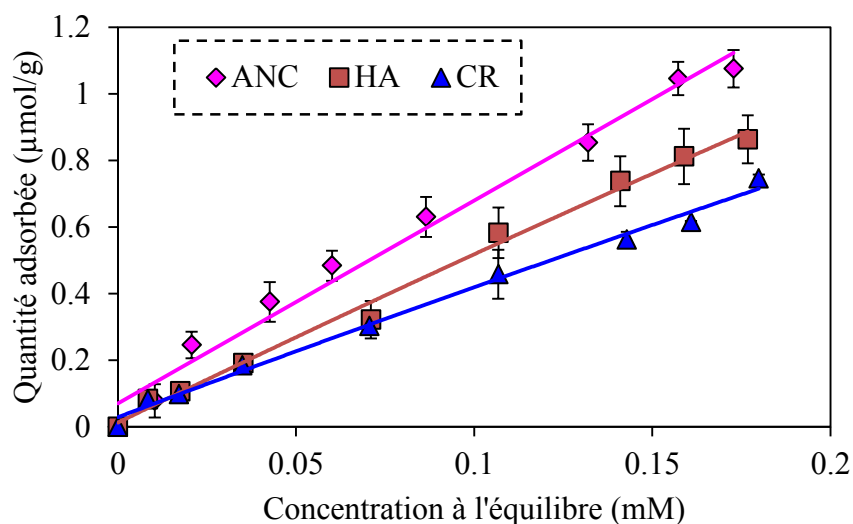


Figure III-9 : Variation de la quantité de fusidate adsorbée à 37 °C par les apatites synthétisées en fonction de la concentration résiduelle de fusidate en solution à l'équilibre.

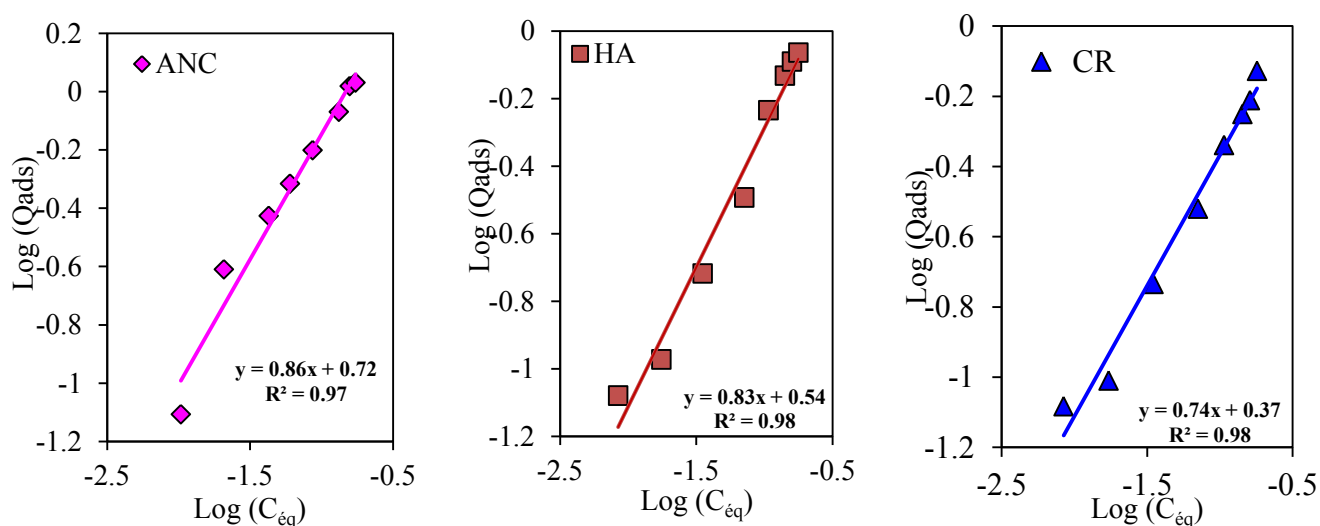


Figure III-10 : Linéarisation des isothermes de Freundlich pour les supports apatitiques ANC, HA et CR.

Tableau III-3 : Tableau récapitulatif des paramètres d'adsorption (a et m) déterminés pour les trois supports apatitiques étudiés (ANC, HA et CR).

Support	m	Ordonnée à l'origine	a (mL/g)	R ²
ANC	0,86	0,72	5,19	0,97
HA	0,83	0,54	3,45	0,98
CR	0,74	0,37	2,38	0,98

II-2-2-3- Influence de la composition chimique du milieu sur l'adsorption de fusidate

II-2-2-3-1- Influence du pH sur l'adsorption

Le pH est le facteur le plus important affectant le processus d'adsorption. L'influence du pH a été examinée sur l'apatite nanocristalline carbonatée, du fait qu'elle présente la plus grande capacité d'adsorption. Cependant, l'étude a été limitée à une faible gamme de pH, afin d'éviter toute éventuelle altération des caractéristiques physicochimiques du support utilisé (solubilité du support, précipitation d'autres phases). Le solide a été dispersé dans des solutions d'adsorbat dont les valeurs initiales de pH ont été ajustées à 7,8 et 9,5 ; les suspensions obtenues à l'équilibre ($pH_{\text{équilibre}}$) ont des valeurs respectivement proches de 7,2 et 8,2.

Les isothermes d'adsorption obtenues en milieu KCl (1 mM) à 37°C aux pH considérés sont toujours de type Freundlich (Figure III-11). L'examen des résultats obtenus montre que la variation du pH du milieu d'incubation affecte les propriétés d'adsorption du matériau. On remarque que l'augmentation du pH des solutions d'adsorbat s'accompagne d'une diminution de la constante d'affinité adsorbant-adsorbat. Ainsi, à pH 7,2, la capacité de rétention du support (5,19 mL/g) est plus grande que celle obtenue à pH 9,5 (3,14 mL/g). Il semble que le milieu relativement neutre favorise l'adsorption des molécules de fusidate sur l'apatite nanocristalline carbonatée.

II-2-2-3-2- Influence des ions phosphate

L'influence des ions phosphate ajoutés dans les solutions d'adsorption sur la fixation de fusidate par l'apatite a été examinée dans la gamme de 1 à 5 mM, à une force ionique constante proche de 11 mM.

Les isothermes d'adsorption obtenues sont toujours de type Freundlich (Figure III-12). La comparaison des paramètres d'adsorption déterminés (Tableau III-4), à partir de la linéarisation de l'isotherme de Freundlich, suggère que la présence des ions phosphate dans le milieu inhibe la fixation des molécules de fusidate à la surface de l'apatite. En effet, la capacité de rétention du matériau vis-à-vis des molécules de fusidate diminue lorsque la teneur ajoutée en ions phosphate dans le milieu d'adsorption croît (Tableau III-5).

II-2-2-3-2- Influence des ions carbonate

L'effet des ions carbonate sur l'adsorption de fusidate de sodium sur l'ANC a été examiné par ajout d'une concentration en ions carbonate allant de 1 mM à 5 mM dans le milieu d'incubation, à une force ionique constante proche de 11 mM. Les isothermes d'adsorption obtenues (Figure III-13) montrent que la présence des espèces carbonate dans le milieu d'adsorption inhibe la fixation des molécules de fusidate. La capacité de rétention du matériau est relativement importante en l'absence d'ions carbonate ajoutés mais l'effet de ces espèces est moins prononcé lorsque leur teneur passe de 1 à 5 mM (tableau III-4).

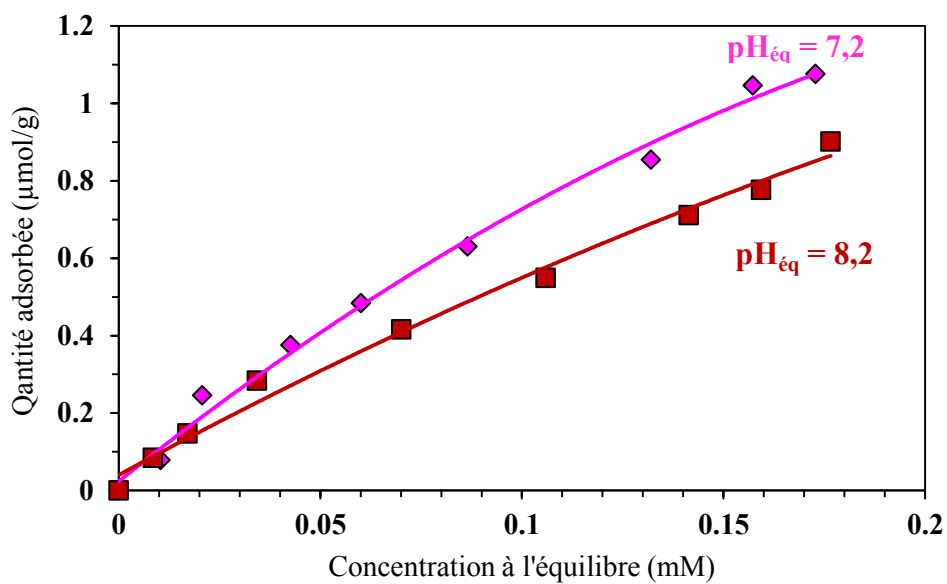


Figure III-11 : Isothermes d'adsorption du fusidate par l'ANC à différents pH.

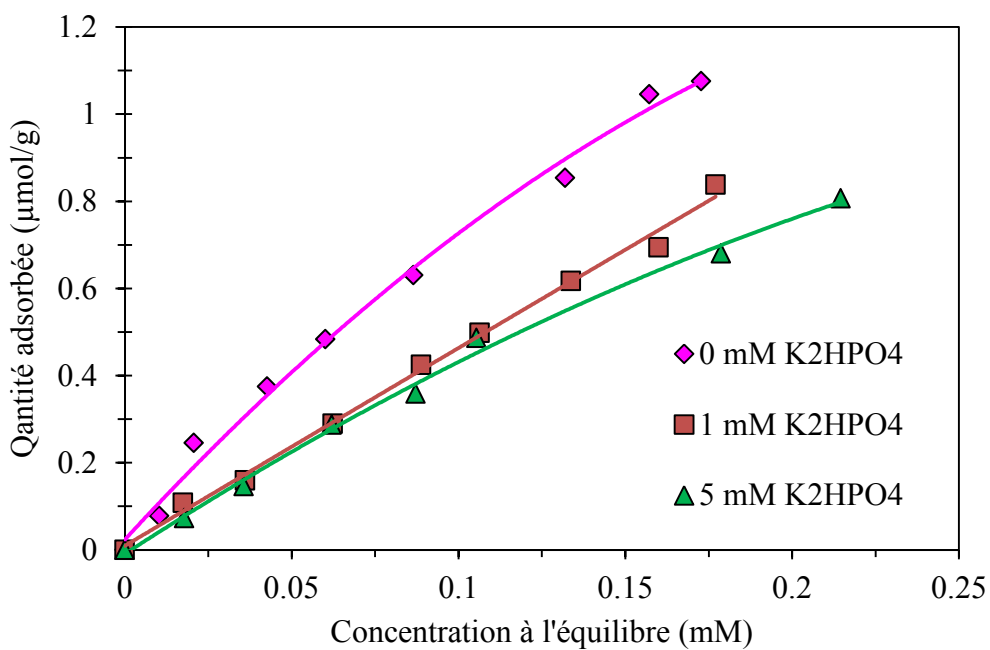


Figure III-12 : Isothermes d'adsorption du fusidate par l'ANC en fonction de la concentration d'ions phosphate ajoutés dans le milieu.

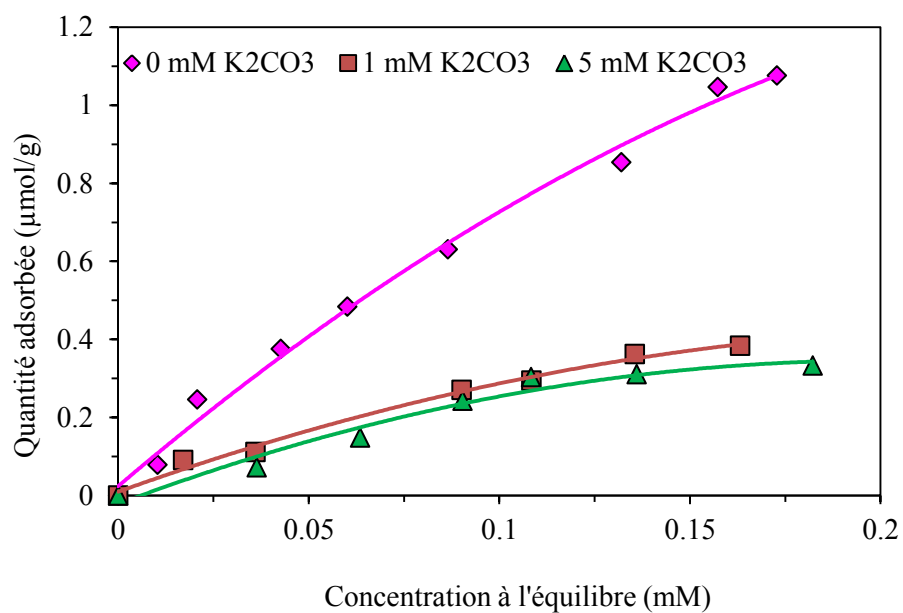


Figure III-13 : Isothermes d'adsorption du fusidate par l'ANC en fonction de la concentration d'ions carbonate ajoutés dans le milieu.

Tableau III-4: Influence de la composition chimique de la solution sur les paramètres d'adsorption du fusidate par l'apatite nanocristalline carbonatée (ANC).

Milieu	Concentration	Paramètres d'adsorption		Coefficient de corrélation
	(mM)	m	a (mL/g)	R ²
Ions phosphate ajoutés	0	0,86	5,19	0,97
	1	0,90	3,74	0,99
	5	0,97	3,85	0,99
Ions carbonate ajoutés	0	0,86	5,19	0,97
	1	0,69	1,38	0,97
	5	0,99	2,29	0,92

II-2-3- Caractérisation du support après adsorption par spectroscopie infrarouge

Le solide récupéré après adsorption a été caractérisé par spectrophotométrie IR dans le but de préciser la nature des molécules d'adsorbat fixées à la surface du matériau de mettre en évidence toute éventuelle modification des positions des bandes caractéristiques des groupements fonctionnels de ces espèces suite à leur interaction avec la surface du support. Cette étude a porté sur le support ANC étant donné qu'il présente la plus grande capacité de rétention vis-à-vis de l'antibiotique.

La figure III-14 montre les spectres d'absorption IR dans le domaine 450-4000 cm^{-1} pour l'apatite ANC avant et après contact avec une solution de fusidate de sodium de concentration initiale voisine de 0.2 mM. L'analyse des résultats obtenus laisse penser que l'incubation de l'apatite ANC n'induit aucune modification notable dans le spectre d'absorption infrarouge du matériau. L'absence de bandes caractéristiques des molécules d'adsorbat pourrait être liée au faible taux de rétention noté (< 11 %) dans les conditions expérimentales examinées.

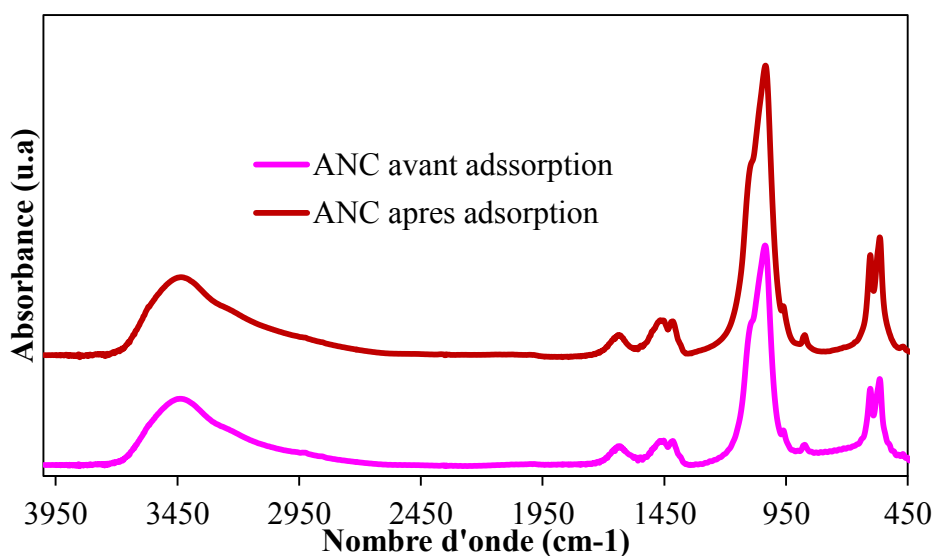


Figure III-14 : Spectres d'absorption IR de l'apatite ANC avant et après adsorption

II-3- DISCUSSION

L'adsorption du fusidate de sodium par l'hydroxyapatite, l'apatite nanocristalline carbonatée et le ciment de référence se produit selon une cinétique rapide dans les conditions examinées. L'équilibre d'adsorption est atteint durant les premières minutes de mise en contact du support avec la solution d'adsorption. Cette observation témoigne d'une grande réactivité de surface des cristaux apatitiques utilisés vis-à-vis des molécules de fusidate. Des processus d'adsorption rapides ont également été notés pour des molécules présentant divers groupements fonctionnels ; c'est le cas d'acides aminés [Benaziz et al., 2001], de bisphosphonates [Errassifi et al., 2014 ; Pascaud et al., 2014] ou de protéines [Barroug et al., 1998 ; Ouizat, 2000].

La rétention du fusidate de sodium par les supports étudiés suit la loi de type Freundlich ; la quantité de molécules d'adsorbat fixées par le support croît linéairement avec leur concentration résiduelle en solution et aucune saturation n'a été observée dans la gamme de concentrations examinée. L'isotherme de type Freundlich ainsi obtenue est caractéristique d'une faible capacité d'adsorption des matériaux vis-à-vis des espèces fusidate. Des observations similaires ont été rapportées pour l'interaction de divers phosphates de calcium apatitiques avec des molécules simples telles la glycine et l'ion acétate [Barroug et al., 1985], la serine [Benaziz et al., 2001] et le cis-platine [Barroug et Glimcher, 2002].

L'étude comparée de la capacité de rétention par unité de masse des apatites vis-à-vis des molécules de fusidate conduit au classement suivant : ANC > HA > CR. Cette différence de comportement des apatites étudiées peut être discutée sur la base de leurs caractéristiques physicochimiques. Les apatites nanocristallines (ANC) sont formées de nanocristaux dotés d'une grande surface spécifique et d'une surface riche en environnements labiles et facilement échangeables [Rey et al., 1996]. Ces environnements sont associés à une couche hydratée de surface constituée essentiellement d'ions bivalents très labiles (Ca^{2+} , HPO_4^{2-} et CO_3^{2-} ...). Ces espèces ioniques, non observées dans l'apatite bien cristallisée (HA), gouvernent les processus de dissolution, de maturation et d'échanges ioniques de ces matériaux ; ils constituent des sites privilégiés pour les molécules d'adsorbat et confèrent à ces matériaux des propriétés d'échange et d'adsorption considérables [Errassifi et al., 2014 ; Pascaud et al., 2014; Benaziz, 2001, Ouizat 1999, Cazalbou et al., 2004]. Les environnements labiles ne constituent pas à eux seuls la force motrice du processus d'adsorption ; les propriétés microstructurales et la stoechiométrie sont également des facteurs à prendre en considération dans les phénomènes qui interviennent à l'interface entre phosphates apatitiques et milieux environnants. La faible capacité de rétention du ciment par rapport aux autres supports pourrait être liée à l'hétérogénéité de sa composition chimique. En effet, l'analyse physicochimique du ciment obtenu met en évidence la présence de pics caractéristiques d'une apatite carbonatée et également de vaterite résiduelle non consommée pendant la réaction de prise.

L'évaluation du rôle des ions déterminant la charge de surface (ions phosphate, carbonate et hydronium) sur la fixation des molécules d'adsorbat permet de préciser l'aspect physicochimique de l'interaction adsorbant-adsorbat. La modification de la teneur en ions actifs en solution affecte considérablement le processus d'adsorption. La diminution de la constante d'affinité lors de l'élévation du pH du milieu pourrait être la conséquence directe de l'évolution du degré d'ionisation des groupements fonctionnels à la surface des cristaux. La présence d'ions phosphate et carbonate dans le milieu inhibe la fixation des espèces fusidate, suite à leur compétition pour les sites actifs à la surface du minéral. Des tendances similaires ont été rapportées dans la littérature pour l'interaction de l'HA avec des bisphosphonates [Errassifi, 2011 ; Pascaud, 2012], des protéines acides [Barroug et al., 1998; Ouizat, 2000, Shimabayashi et al., 1991, Kondori et al., 1992] et des acides aminés [Moreno et al., 1984, Benaziz, 2002].

L'étude menée sur le rôle du pH sur la fixation de l'antibiotique a été portée sur un seul support et a été limitée à une faible gamme de pH afin d'éviter toute éventuelle altération des caractéristiques physicochimiques du support examiné (solubilité du support, précipitation d'autres phases). Toutefois, la tendance notée indique que l'élévation de pH s'accompagne d'une réduction de la capacité d'adsorption du matériau. Il a été établi dans la littérature, sur la base d'études menées avec des phosphates de calcium apatitiques présentant des caractéristiques variables (compositions chimique, charge de surface...) et des molécules d'adsorbats présentant des groupements fonctionnels acides ou basiques, que l'élévation du pH des solutions d'adsorbats s'accompagne d'une diminution des paramètres d'adsorption des espèces anioniques et favorise la fixation de molécules basiques [Barroug et al., 1998, Errassifi, 2011].

CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'évaluer la réactivité du fusidate de sodium vis-à-vis de phosphates de calcium apatitiques dans diverses conditions expérimentales. La rétention des molécules de fusidate par les cristaux apatitiques se fait selon une cinétique rapide, ce qui laisse penser à une grande réactivité adsorbant-adsorbat. Cependant, le taux d'adsorption obtenu pour les différents supports apatitiques étudiés reste assez faible et ne dépasse guère 11%. Les isothermes d'adsorption montrent que le modèle de Freundlich décrit de manière satisfaisante l'adsorption de fusidate par les supports apatitiques examinés. Cependant, l'affinité adsorbant-adsorbat dépend des caractéristiques physicochimiques du support et de la composition de la solution.

PARTIE B
CIMENTS CHARGES EN
ANTIBIOTIQUE :
ELABORATION & CARACTERISATION
PHYSICOCHIMIQUE

INTRODUCTION

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous nous intéressons à l'élaboration et à la caractérisation physicochimique des ciments chargés en antibiotique sous forme hydrosoluble, le fusidate de sodium, ou peu soluble, l'acide fusidique, afin de mettre en évidence leurs effets éventuels sur les propriétés physicochimiques du ciment.

Nous examinerons dans cette étude l'influence de la méthode d'incorporation de l'antibiotique (dans la phase liquide ou la phase solide), de sa dose et également du rapport liquide/solide (L/S) sur les caractéristiques du matériau obtenu. En effet, la réaction de prise et les propriétés rhéologiques de la pâte, la microstructure et également les propriétés mécaniques du ciment peuvent être influencées par l'introduction du médicament soit dans la phase liquide soit dans la phase solide, par sa concentration ainsi que par la quantité d'eau (L/S) utilisée lors de son élaboration. Néanmoins, il n'existe pas de règle générale pour prédire l'effet de ces facteurs sur les propriétés physicochimiques des ciments.

I- ELABORATION DU CIMENT

I-1- Protocole expérimental

Le protocole d'élaboration du ciment chargé en antibiotique est le même que celui utilisé pour l'élaboration du ciment de référence (chapitre II). Le système ciment-antibiotique utilisé dans ce travail a été élaboré en associant l'antibiotique au ciment au moment de la préparation de la pâte. La Fusidine est le nom générique de l'antibiotique choisi pour cette étude ; elle est disponible sous deux formes génériques présentant des solubilités différentes dans l'eau : l'acide fusidique (FA) pratiquement insoluble dans l'eau et le fusidate de sodium (SF) assez soluble dans l'eau (50 mg/mL)¹¹.

L'acide fusidique peu soluble dans l'eau est introduit (Figure III-15) dans la phase solide (m_s) c'est-à-dire au mélange de brushite et de vatérite pour donner les ciments que nous nommerons par la suite CFA, alors que le fusidate de sodium soluble dans l'eau est dissout dans la phase liquide (m_l) qui sera utilisée pour la préparation de la pâte et conduira au ciment que nous désignerons par la suite CSF. Dans ce travail nous avons testé différentes concentrations d'antibiotique, à savoir 3 %, 6 % et 9 % ; les pourcentages massiques en antibiotique (m_{FA}/m_s ou m_{SF}/m_s) sont calculés par rapport à la masse (m_s) de la phase solide (mélange équimassique de vatérite et brushite) nécessaire pour élaborer la pâte du ciment. L'influence du rapport L/S sur les caractéristiques du ciment préparé a également été examinée en faisant varier la quantité d'eau nécessaire pour son élaboration ; pour cela, les valeurs de L/S testées sont de 0,7 et 0,8. Les différentes compositions de ciments chargés en fusidate de sodium ou en acide fusidique et élaborées à partir de 1 g de vatérite et de 1 g brushite sont répertoriées respectivement dans les tableaux III-5 et III-6.

¹¹ <http://www.scbt.com/datasheet-202164-fusidic-acid-sodium-salt.html> (consulté le 16 / 03/ 2015)

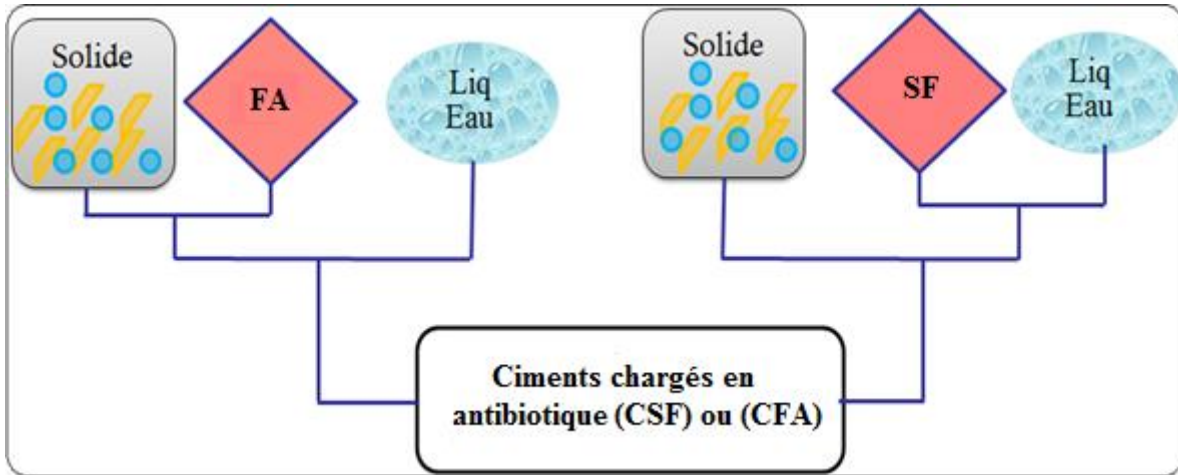


Figure III-15 : Modes d'incorporation de l'antibiotique (FA et SF) dans le ciment.

II- CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE

II-1- Caractérisation par diffraction des rayons X

La figure III-16 présente le diagramme DRX du ciment de référence comparé aux diagrammes DRX des ciments chargés en acide fusidique (CFA) ou en fusidate de sodium (CSF). L'analyse par DRX atteste que quel que soit le mode d'incorporation de l'antibiotique (dans la phase liquide ou dans la phase solide) et sa forme (SF ou FA), la composition chimique finale du ciment obtenu n'est pas modifiée ; celle-ci reste analogue à celle d'un ciment de référence c'est-à-dire constituée d'une matrice apatitique analogue au minéral osseux associée à une proportion de vatérite n'ayant pas réagi pendant la prise.

II-2- Spectroscopie infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge d'un ciment de référence (CR), d'un ciment incluant du fusidate de sodium (CSF) ou de l'acide fusidique (CFA), ainsi que le spectre du fusidate de sodium seul sont présentés sur la Figure III-17. L'analyse par spectroscopie infrarouge montre la présence des bandes caractéristiques de l'apatite et de la vatérite et atteste que l'introduction de l'antibiotique ne modifie pas la composition finale du ciment ; ces observations confirment les résultats obtenus par analyse DRX. La spectroscopie infrarouge met en évidence également la présence des bandes caractéristiques du fusidate de sodium vers 1267 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} et 2970 cm^{-1} ; ces bandes sont également présentes sur le spectre du ciment CFA.

Tableau III-5 : Compositions du ciment de référence et des ciments chargés avec différents pourcentages massiques (m_{SF}/m_s) de fusidate de sodium et préparés avec différents rapports L/S.

Antibiotique (m_{SF}/m_s)	Phase Solide (S)			Phase Liquide (L)		L/S (m_L/m_s) ($mL.g^{-1}$)
	Masse de brushite (g)	Masse de vatérite (g)	Masse totale de solide (m_s) (g)	Masse d'eau (m_L) (g)	Masse SF (m_{SF}) (g)	
0 %	1	1	2	1,4	0	0,7
	1	1	2	1,6	0	0,8
3 %	1	1	2	1,4	0,06	0,7
	1	1	2	1,6	0,06	0,8
6 %	1	1	2	1,4	0,12	0,7
	1	1	2	1,6	0,12	0,8
9 %	1	1	2	1,4	0,18	0,7
	1	1	2	1,6	0,18	0,8

Tableau III-6 : Compositions du ciment de référence et des ciments chargés avec différents pourcentages massiques (m_{FA}/m_s) d'acide fusidique et préparés avec différents rapports L/S.

Antibiotique (m_{FA}/m_s)	Phase Solide (S)				Phase Liquide (L)	Rapport L/S (m_L/m_s) ($mL.g^{-1}$)
	Masse de brushite (g)	Masse de vatérite (g)	Masse de FA (m_{FA}) (g)	Masse totale de solide (m_s) (g)	Masse d'eau (m_L) (g)	
0 %	1	1	0	2,00	1,40	0,7
	1	1	0	2,00	1,60	0,8
3 %	1	1	0,06	2,06	1,44	0,7
	1	1	0,06	2,06	1,65	0,8
6 %	1	1	0,12	2,12	1,48	0,7
	1	1	0,12	2,12	1,70	0,8
9 %	1	1	0,18	2,12	1,53	0,7
	1	1	0,18	2,12	1,74	0,8

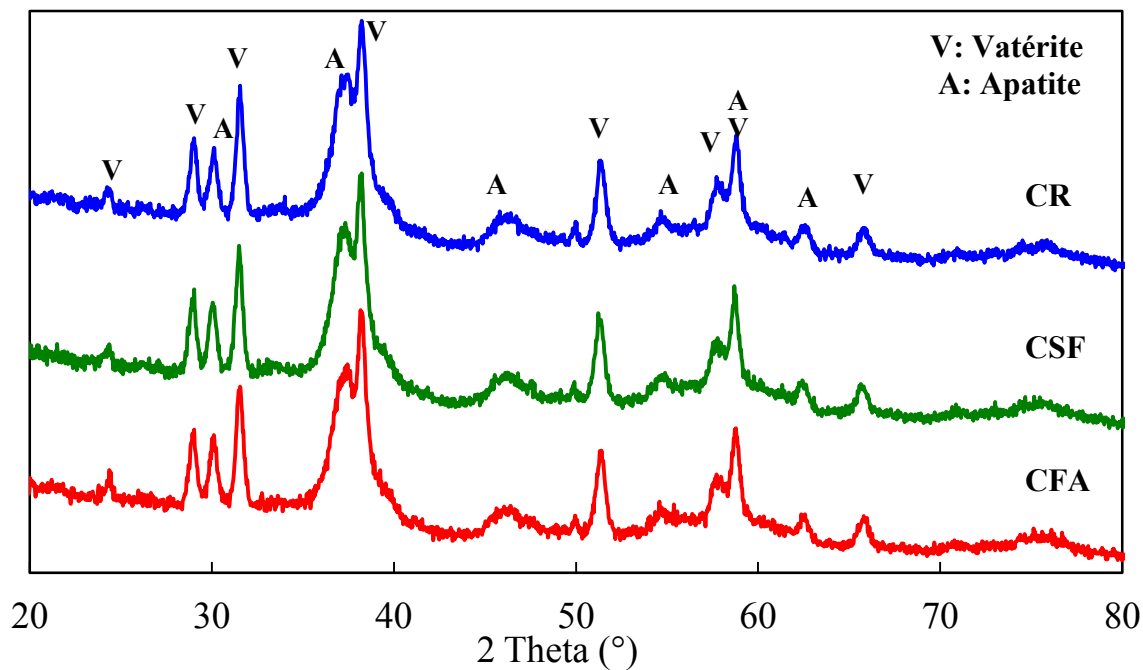


Figure III-16 : Diagrammes de DRX des différents types de ciments élaborés : ciment de référence (CR), ciment incluant du fusidate de sodium (CSF9%), et ciment incluant de l'acide fusidique (CFA9%).

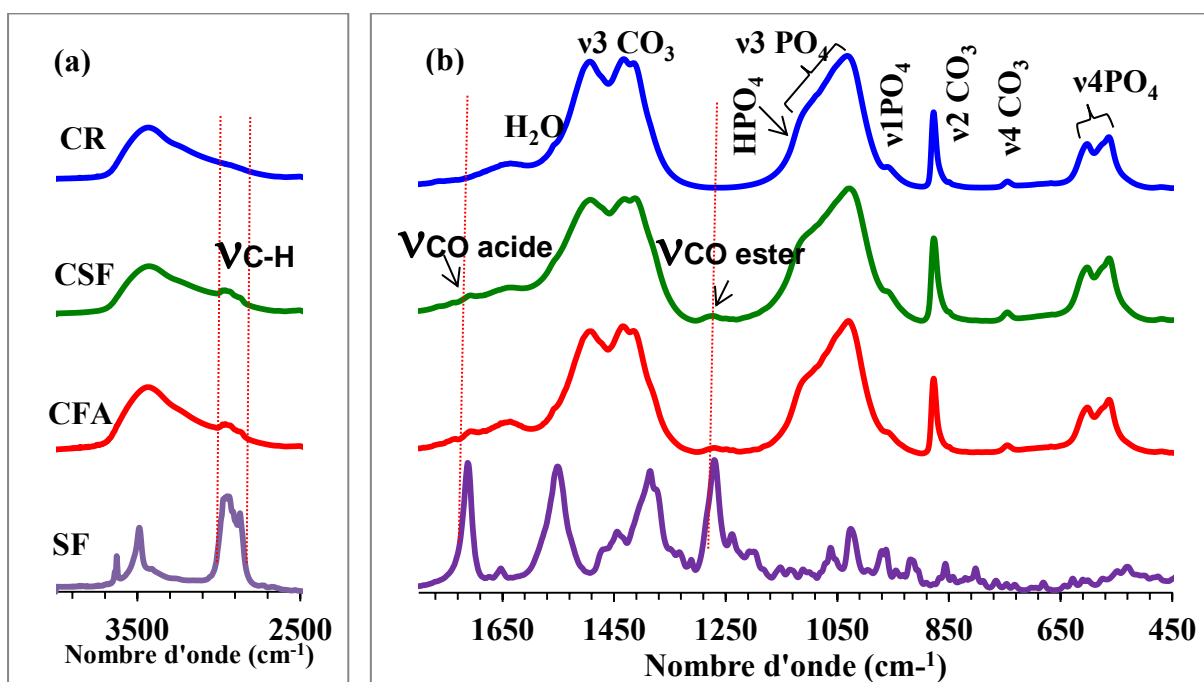


Figure III-17 : Spectres FTIR d'un ciment de référence (CR), d'un ciment chargé en fusidate de sodium (CSF), d'un ciment chargé en acide fusidique (CFA9%) et du fusidate de sodium (CSF9%) dans les régions (a) 4000-2500 cm^{-1} et (b) 1800-450 cm^{-1} .

II-3- Etude de la cinétique de prise du ciment chargé en antibiotique

La réaction de prise des ciments peut être influencée par la présence de l'antibiotique, introduit soit dans la phase liquide soit dans la phase solide du ciment, ce qui peut affecter les caractéristiques finales du matériau. Ainsi, l'ajout d'un antibiotique peut modifier la cinétique de prise. Par exemple, certaines molécules interagissent avec les ions calcium et phosphate dans la solution [Bigi et al., 2004], ou peuvent complexer les ions calcium [Ratier et al., 2001 ; Ginebra et al., 2001], ce qui entraîne un retard dans la précipitation du produit final et par conséquent modifie la cinétique de la réaction de prise du ciment. Le but de cette partie est d'étudier l'effet de l'incorporation du fusidate de sodium dans le ciment sur la cinétique de la formation de l'apatite au cours de la prise du ciment.

II-3-1- Protocole expérimental

Le protocole utilisé pour l'élaboration des ciments chargés en antibiotique pour l'étude de la cinétique de prise est le même que celui décrit précédemment pour le ciment de référence (chapitre II). Le principe de base repose sur la réactivité d'un mélange constitué de vaterite et de brushite, en proportions massiques égales. Le système ciment-antibiotique a été préparé en associant l'antibiotique (SF ou FA) au ciment au moment de la préparation de la pâte. Les rapports liquide/solide (L/S) examinés sont de 0,7 et 0,8.

II-3-2- Résultats et discussion

II-3-2-1- Influence de l'incorporation du principe actif

Les Figures III-18 et III-19 présentent respectivement les spectres FTIR des ciments, préparés avec un rapport L/S de 0,7, chargés en fusidate de sodium (CSF) ou en acide fusidique (CFA) à différentes concentrations, comparés à celui du ciment de référence (CR), après différents temps de maturation dans une étuve à 37°C et dans une atmosphère saturée en eau. Nous présentons uniquement les spectres qui mettent en évidence une évolution significative des phases lors de la prise du ciment. Dans le cas des ciments chargés en fusidate de sodium, nous pouvons nettement observer que, déjà à $t = 2$ h et encore plus à $t = 4$ h et $t = 6$ h, la disparition de la phase brushitique (décroissance de la bande caractéristique à 525 cm^{-1}) en faveur de la formation d'apatite (mise en évidence en particulier par l'augmentation de la bande à 603 cm^{-1}) est plus rapide pour les ciments incluant du fusidate (CSF) que pour le ciment de référence (CR). Ceci atteste que la présence du fusidate de sodium accélère la dissolution de la brushite et par conséquent la formation de l'apatite ; de plus, cet effet apparaît dose dépendant. Après 48 h, la bande caractéristique des groupements phosphates de la brushite à 525 cm^{-1} n'apparaît ni pour les ciments chargés en antibiotique, ni pour le ciment de référence.

Afin de caractériser plus finement l'effet de l'introduction du fusidate de sodium sur l'évolution de la réaction de prise du ciment, une analyse semi-quantitative des différents constituants du ciment a été réalisée par spectroscopie FTIR en suivant l'évolution de l'intensité des bandes à 525 cm^{-1} pour la brushite et celle à 603 cm^{-1} pour l'apatite. Pour cela, nous avons attribué arbitrairement les intensités maximales à 100 % massique pour chaque constituant du ciment, soit juste à 5 min pour la brushite et la vatérite et à 48 h de maturation pour l'apatite dans le cas du ciment de référence et de celui chargé en fusidate de sodium.

L'évolution de la quantité de brushite consommée et de la quantité d'apatite formée au sein du ciment est présentée sur les Figures III-20 (a) et (b). Ces résultats confirment que pendant les deux premières heures de maturation du ciment, la présence de fusidate de sodium dans le ciment ne semble pas avoir d'influence significative sur la cinétique de la réaction de prise du ciment. En revanche, entre 4 h et 24 h, la courbe de la cinétique de prise du ciment chargé en fusidate de sodium se détache de celle du ciment de référence, témoignant d'un avancement plus rapide de la réaction de dissolution-reprécipitation.

Pour le ciment CFA dans lequel l'acide fusidique a été introduit dans la phase solide du ciment, l'évolution de l'intensité de la bande de la brushite (bande à 525 cm^{-1}) et de celle de l'apatite (bande à 603 cm^{-1}) suit parfaitement celle du ciment de référence (Figure III-19). L'analyse semi-quantitative (Figures III-21 (a) et (b)) confirme ces résultats. Comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, l'acide fusidique a une solubilité très faible dans l'eau. Il ne jouera pas ainsi un grand rôle dans le processus de dissolution-reprécipitation impliqué dans la réaction de prise du ciment, ce qui explique qu'il n'y ait pas d'effet significatif sur la cinétique de la réaction chimique.

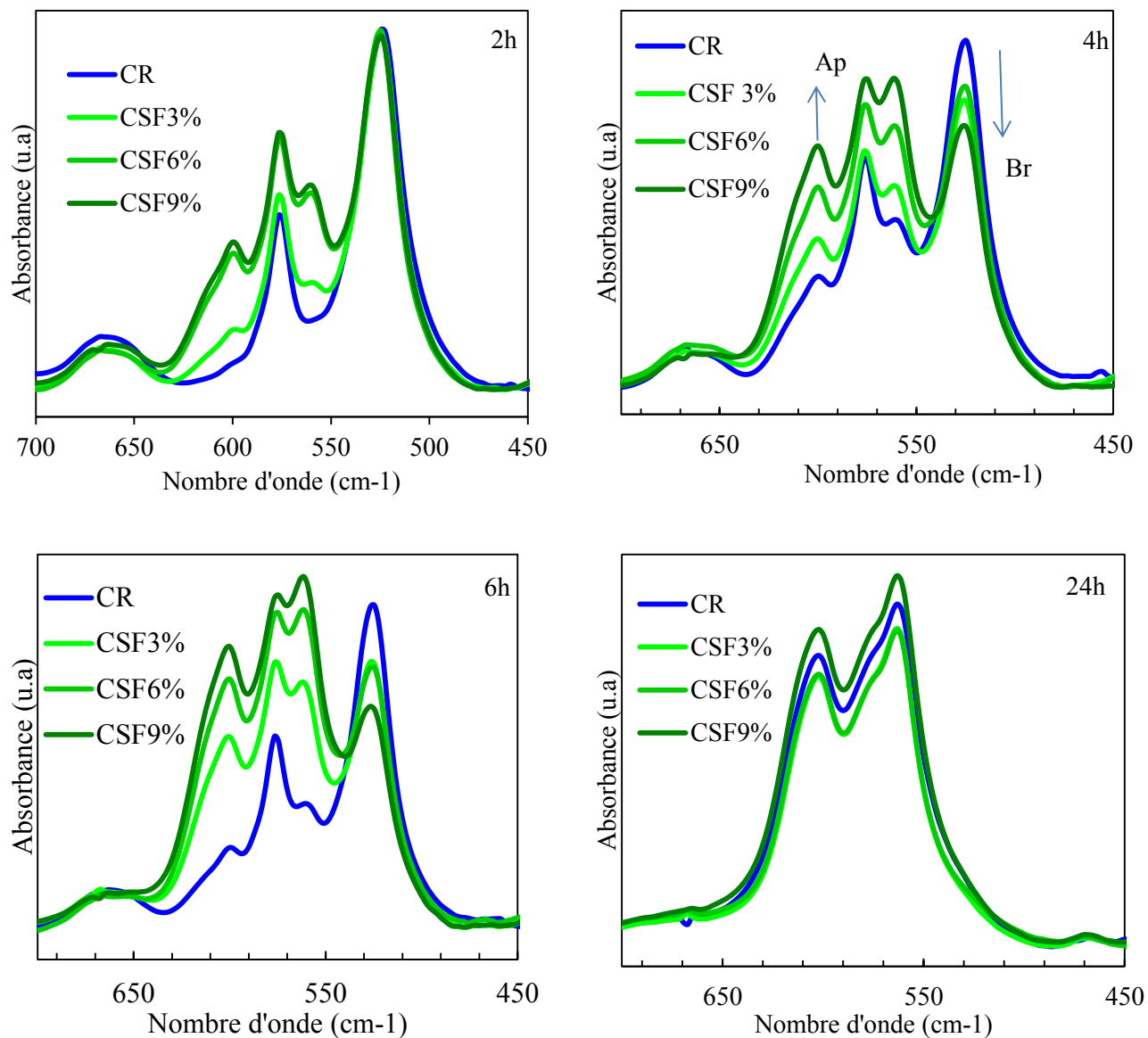


Figure III-18 : Comparaison des spectres FTIR (domaine $\nu_4\text{PO}_4$ 450-700 cm^{-1}) des ciments CR et CSF incluant différentes teneurs de fusidate de sodium et après différents temps de maturation (2 h, 4 h, 6 h et 24 h).

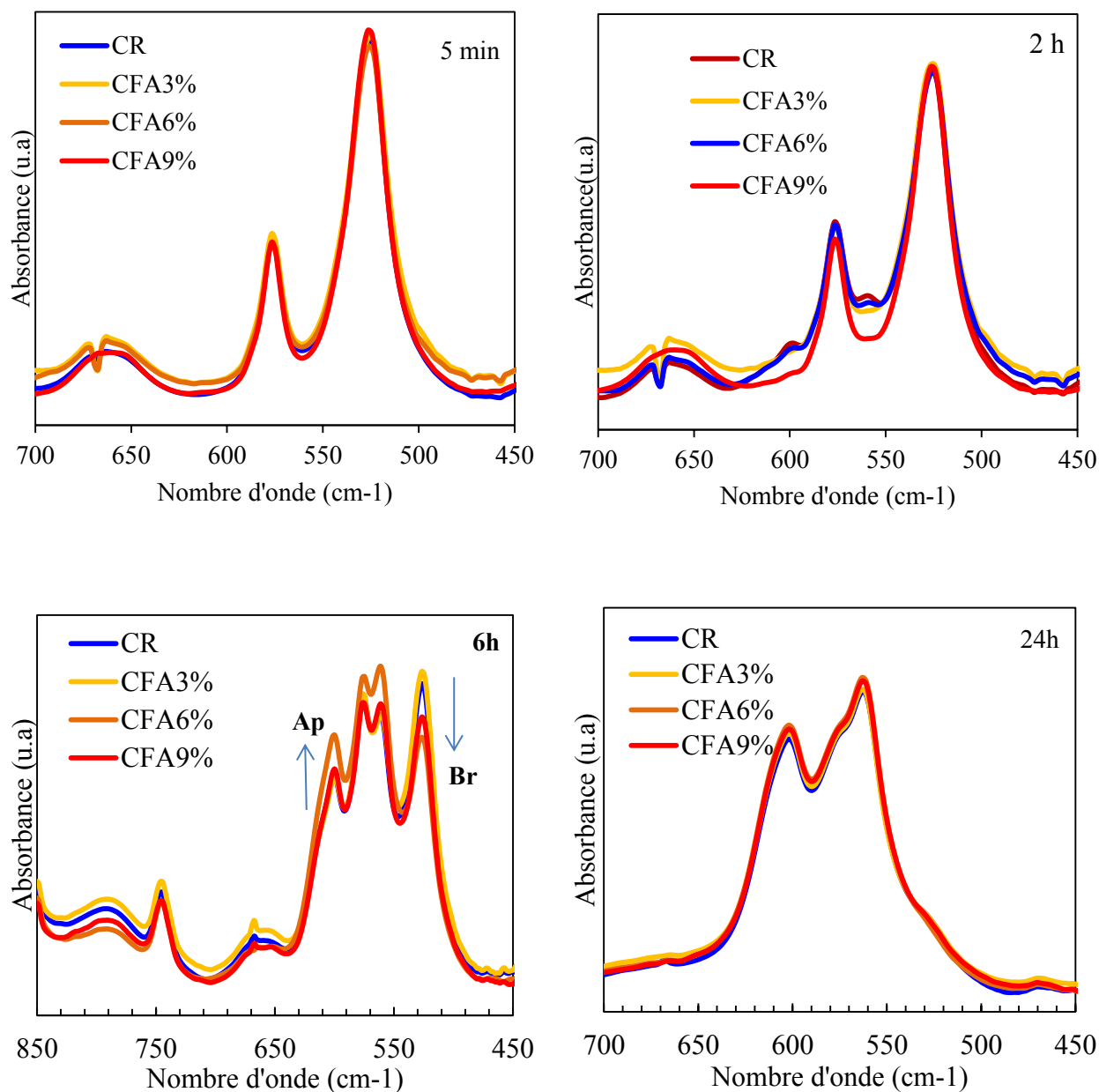


Figure III-19 : Comparaison des spectres FTIR (domaine $\nu_4\text{PO}_4$ 700-450 cm^{-1}) des ciments CR et CFA à différents teneurs en acide fusidique et après différents temps de maturation (5 min, 2 h, 6 h et 24 h).

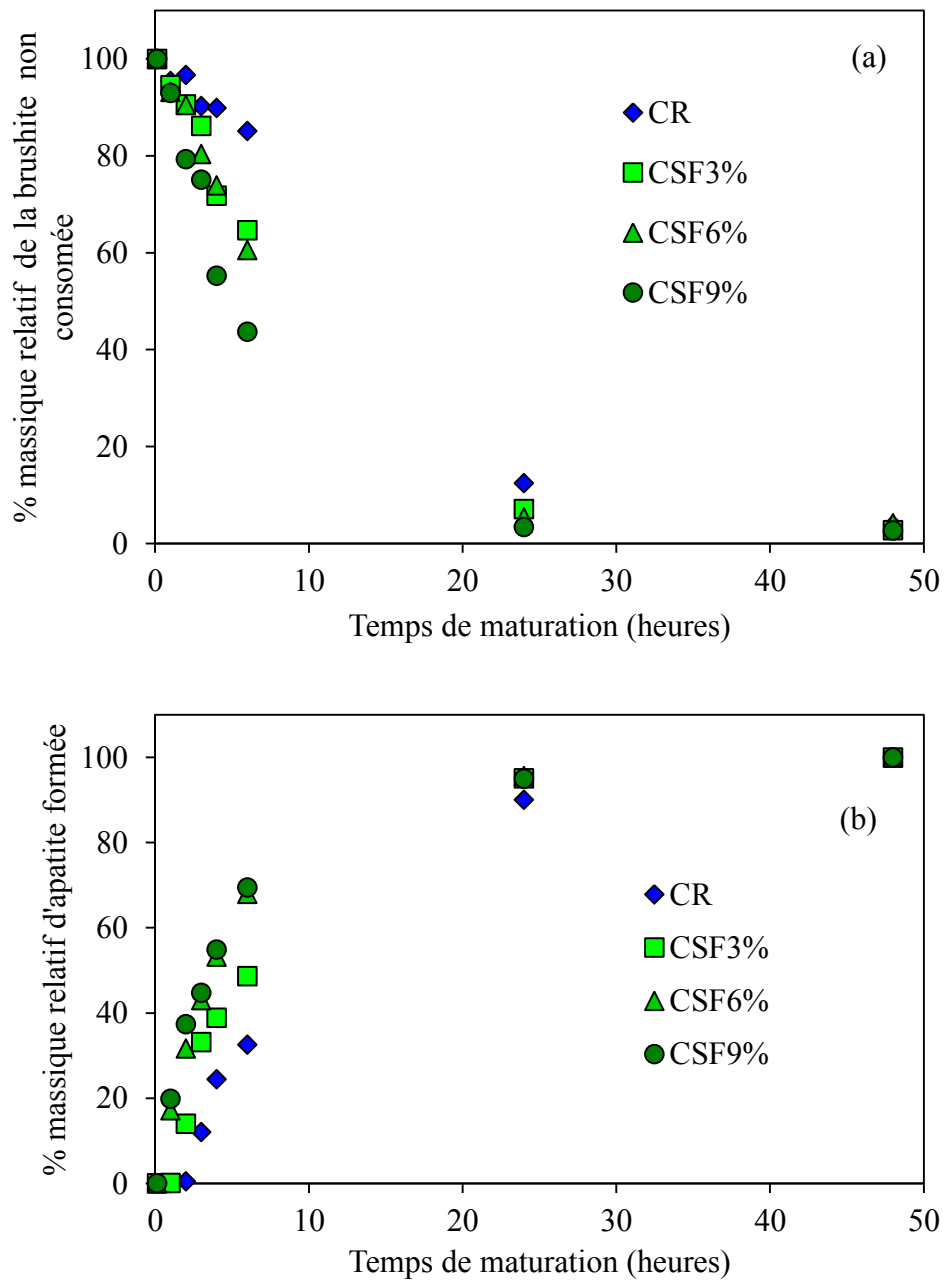


Figure III-20 : Evolution de la quantité relative de brushite restant (a) et de la quantité relative d'apatite formée (b) au sein du ciment (exprimée en pourcentage massique d'après l'évaluation semi-quantitative réalisée à partir des intensités de bandes des spectres FTIR : bande à 525 cm^{-1} pour la brushite et bande à 603 cm^{-1} pour l'apatite) au cours du temps et en fonction de la quantité de fusidate de sodium introduite dans le ciment.

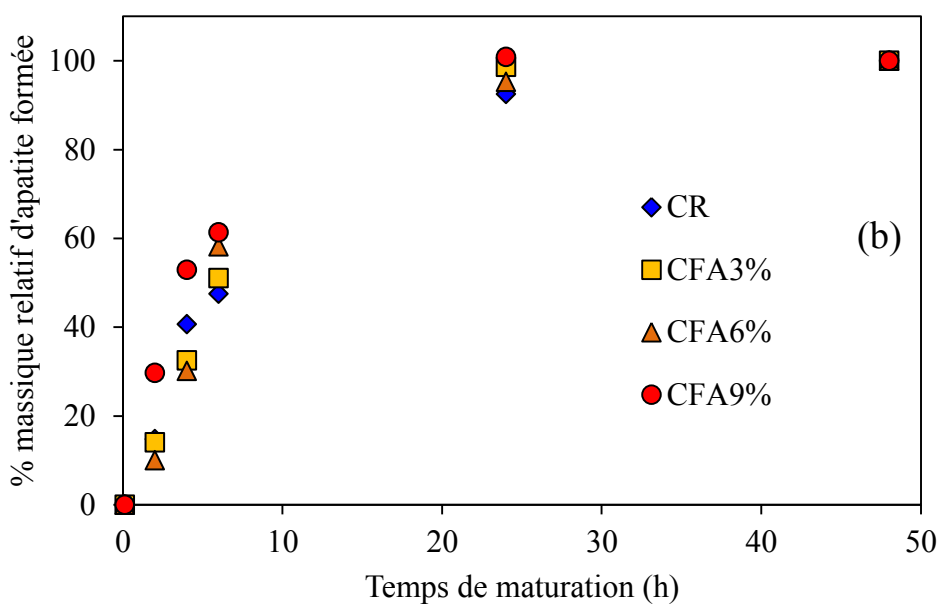
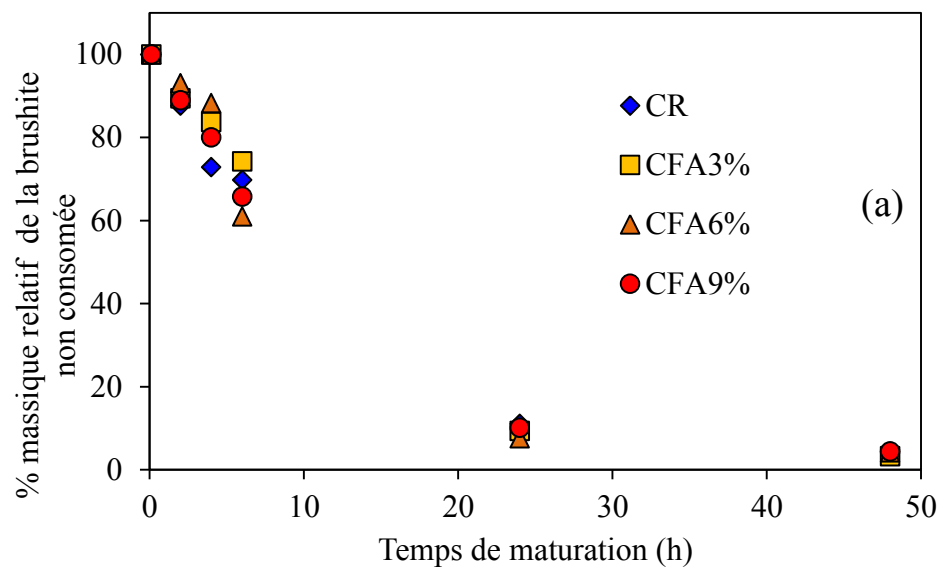


Figure III-21 : Evolution de la quantité relative de brushite restant (a) et de la quantité relative d'apatite formée (b) au sein du ciment (exprimée en pourcentage massique d'après l'évaluation semi-quantitative réalisée à partir des intensités de bandes des spectres FTIR : bande à 525 cm^{-1} pour la brushite et bande à 603 cm^{-1} pour l'apatite) au cours du temps et en fonction de la quantité d'acide fusidique introduite dans le ciment.

II-3-2-2- Influence du rapport L/S sur la cinétique de prise

L'étude de l'effet du rapport liquide/solide (L/S) sur la cinétique de prise a été effectuée sur des ciments préparés avec un rapport L/S égal à 0,7 ou à 0,8. La figure III-22 montre des spectres IR après 6 h d'évolution pour le ciment de référence et le ciment chargé en fusidate de sodium (3, 6 et 9 % m_{SF}/m_S) pour les deux rapports L/S étudiés. Les deux ciments de référence sont notés CR7 et CR8 et les ciments chargés en fusidate de sodium sont notés CSF7 et CSF8, respectivement pour un rapport L/S égal à 0,7 et à 0,8. Dans tous les cas examinés, ciments de référence et ciments chargés en antibiotique, on constate que l'augmentation du rapport L/S accélère la dissolution de brushite et la formation de l'apatite. Cet effet peut s'expliquer par la présence d'une quantité plus importante d'eau qui permet à une quantité plus importante de brushite et de vaterite de se dissoudre (jusqu'à la saturation) et favorise par conséquent la reprécipitation sous une forme d'apatite carbonatée. De plus, l'examen des spectres d'absorption infrarouge des ciments obtenus après 6 h de maturation révèle que les bandes caractéristiques de l'apatite, notamment celles à 562 et 603 cm^{-1} , sont d'autant plus intenses que la dose d'antibiotique est élevée (Figures III-22b, III-22c et III-22d) démontrant ainsi un effet dose-dépendant de la réaction de prise en présence de fusidate de sodium et ce quel que soit le rapport L/S. On montre ici que cet effet est accentué par une augmentation du rapport L/S.

L'analyse semi-quantitative des constituants des ciments, en fonction du temps au cours de la prise et en fonction du rapport L/S, est présentée sur les Figures III-23 et III-24 respectivement pour les ciments CR et CSF. Les résultats obtenus confirment que l'augmentation du rapport L/S accélère dans tous les cas la dissolution de la brushite et par conséquent la formation de l'apatite ; la même tendance a été remarquée pour les ciments avec ou sans antibiotique. Pour le ciment de référence (Figure III-23), l'effet accélérateur de la réaction de prise dû à l'augmentation du rapport L/S est notable durant les premières 24 h ; il devient ensuite moins marqué à 24 h puis nul à 48 h temps au bout duquel on observe la disparition quasi-totale de la brushite et le taux d'apatite formée est proche de sa teneur maximale (100%) quel que soit le rapport L/S. Dans le cas des ciments chargés en antibiotique (Figure III-24), cet effet accélérateur de la prise dû à l'augmentation du rapport L/S n'est plus significatif dès 24 h de prise.

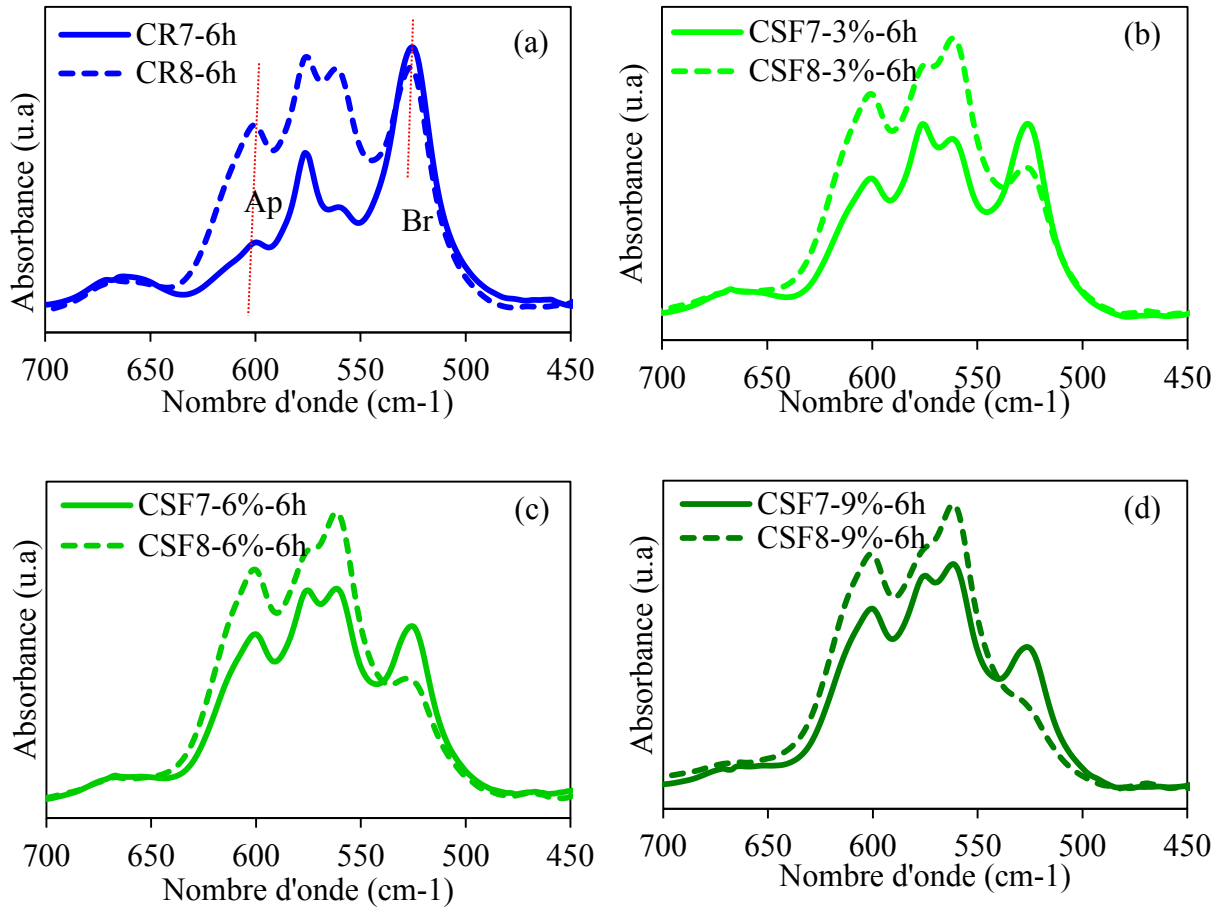


Figure III-22 : Superposition des spectres FTIR (domaine 450–850 cm^{-1}) des ciments préparés avec deux rapports L/S différents et après 6 heures de maturation : ciment de référence CR (a) et ciment chargé avec différentes teneurs en fusidate de sodium CSF (b- 3%, c- 6% et d- 9%).

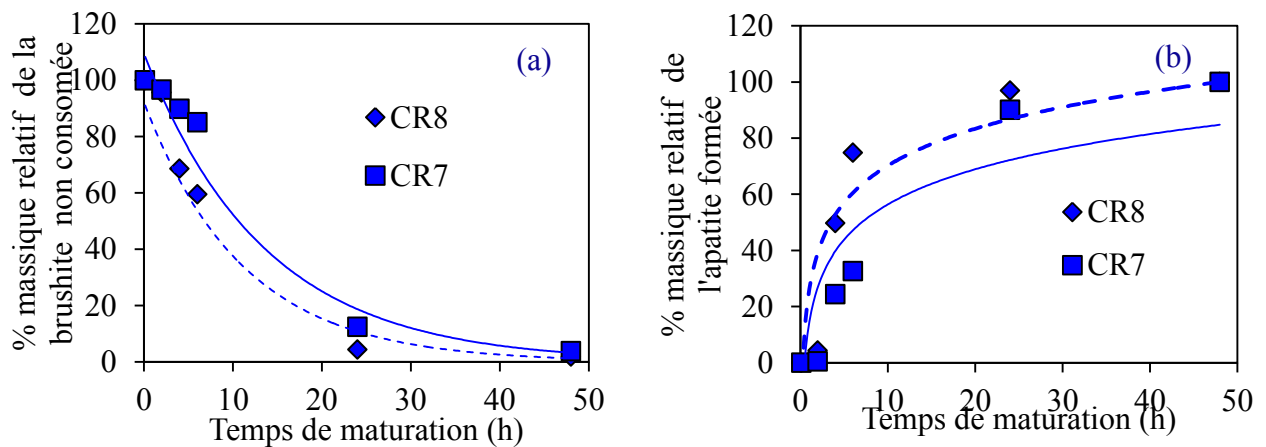


Figure III-23 : Evolution de la quantité relative (en pourcentage massique ; d'après les bandes d'absorption infrarouge) de brushite non consommée (a) et de la quantité relative d'apatite formée (b) pour un ciment de référence au cours du temps et en fonction du rapport L/S.

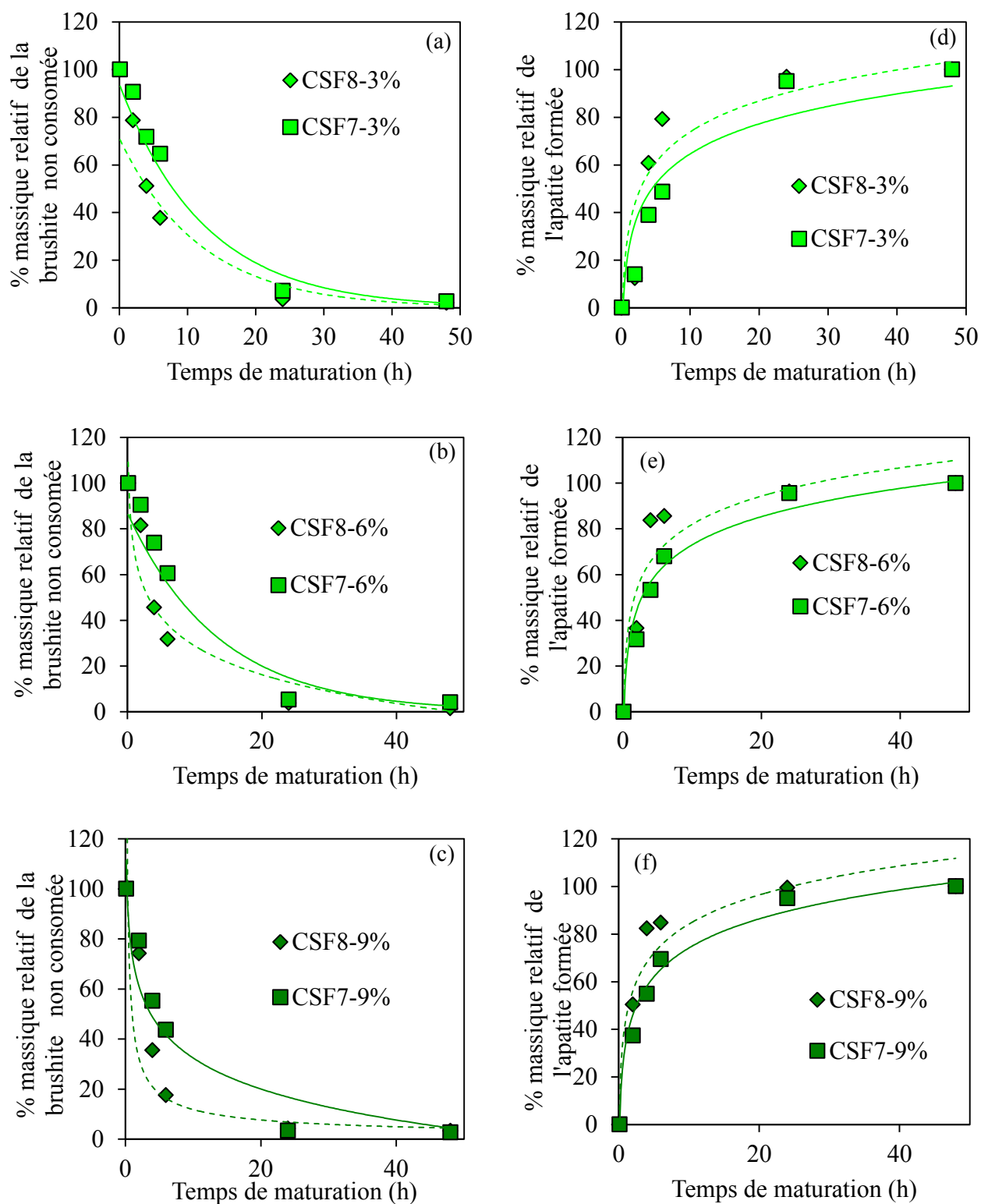


Figure III-24 : Evolution de la quantité de brushite non consommée (a,b,c) et de la quantité relative d'apatite formée (d,e,f), pour les ciments chargés avec différentes teneurs en fusidate de sodium (exprimée en pourcentage massique de la phase solide) au cours du temps et en fonction du rapport L/S (d'après les données de spectroscopie FTIR).

II-3-3- Conclusion

Cette étude a montré que l'introduction du fusidate de sodium dans la formulation du ciment ne changeait pas les mécanismes chimiques qui conduisent à la prise et au durcissement du ciment : au cours de la prise, la brushite se dissout et réagit avec une partie de la vatérite pour former une phase apatitique. Néanmoins une analyse semi-quantitative plus fine par spectroscopie FTIR a mis en évidence une différence dans la vitesse initiale de la réaction chimique de prise des ciments chargés en fusidate de sodium et en acide fusidique, comparés au ciment de référence

Dans le cas du ciment CFA pour lequel l'acide fusidique a été introduit dans la phase solide du ciment, la cinétique de dissolution de la brushite et de formation de l'apatite suit parfaitement celle du ciment de référence ; ceci pourrait s'expliquer par la très faible solubilité de l'acide fusidique qui de ce fait interagit peu avec les espèces ioniques impliquées dans la réaction chimique de prise. Il ne jouera pas ainsi un rôle déterminant dans le processus de dissolution-reprécipitation impliqué dans la réaction de prise du ciment, ce qui explique qu'il n'ait pas d'effet significatif sur la cinétique de la réaction chimique.

Dans le cas du ciment CSF, l'incorporation du fusidate de sodium dans la phase liquide du ciment (sel soluble dans l'eau) accélère la dissolution de la brushite ; cette observation est en accord, d'une part, avec la décroissance plus rapide de l'intensité notamment de la bande à 525 cm^{-1} caractéristique de ce composé observée par spectroscopie FTIR et, d'autre part, avec une acidification du milieu lors de la formation d'apatite. Cette acidification se neutralise partiellement lors de la dissolution de la vatérite, libérant ainsi les ions carbonate et calcium pour former l'apatite carbonatée présente dans le ciment pris.

II-4- Temps de prise

Le temps de prise est une caractéristique importante d'un ciment. On peut définir la prise d'un ciment comme une évolution physique d'un mélange pâteux vers un ciment plus dur. En effet au-delà du temps de prise, le ciment ne peut plus être manipulé sans être endommagé de manière irréversible. Ce temps doit être suffisamment court pour réduire la durée de l'intervention chirurgicale et éviter la diffusion du matériau une fois implanté et suffisamment long pour faciliter le travail du chirurgien au moment de l'implantation. Dans le cas d'un ciment à usage orthopédique, ce temps doit être compris entre 10 et 40 minutes [Driessens et al., 1993].

Nous venons de voir que la cinétique de la réaction chimique de prise des ciments est liée à un phénomène de dissolution-reprécipitation des phases de départ de manière à conduire à un composé plus stable et moins soluble (dans notre cas l'apatite carbonatée). Or si l'introduction de l'antibiotique modifie la vitesse de formation de l'apatite, surtout en l'accélérateur dans le cas du fusidate de sodium, il est raisonnable de penser que son incorporation va engendrer une modification du temps de prise physique.

II-4-1- Technique de mesure

La méthode que nous avons utilisée dans ce travail est la méthode de Gillmore Needle. Cette méthode est décrite par la norme ASTM C 266-89 et son principe est présenté en annexe. Nous avons adapté le protocole normalisé notamment pour limiter la quantité de pâte de ciment nécessaire à chaque essai.

II-4-2- Protocole expérimental

Les échantillons de ciments CR, CFA et CSF ont été préparés selon les protocoles décrits respectivement dans le chapitre II (paragraphe II-1) et le chapitre III (paragraphe I-1). Une quantité (1 g) de pâte du ciment est préparée et placée dans des petits moules en plastique (10 mm de diamètre x 6 mm hauteur). Les moules sont ensuite placés dans un pilulier en présence d'un papier imbibé d'eau pour créer une atmosphère saturée en eau et le tout est placé dans une étuve à 37°C.

Au cours de cette étude du temps de prise physique des ciments, nous avons testé l'éventuel effet de différents paramètres : le rapport L/S (0,7 et 0,8), la présence d'antibiotique FA et SF et la dose d'antibiotique, la présence éventuelle d'un accélérateur de prise bien connu : l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4). Les mesures ont été réalisées en triplicata, toutes les cinq minutes autour du temps de prise approximatif ; ainsi tous les résultats sont à considérer avec une incertitude de ± 5 min.

II-4-3- Résultats et discussion

II-4-3-1- Influence de l'antibiotique sur le temps de prise

Le temps de prise des ciments chargés en antibiotique (CSF et CFA) a été comparé à celui mesuré pour le ciment de référence (CR), et ce pour le même rapport $L/S = 0,7$ (Figure III-25). Les résultats obtenus mettent en évidence des modifications significatives du temps de prise en fonction de la nature du principe actif introduit (FA ou SF) et de sa dose (3, 6, et 9 %). La figure III-25 montre que la présence de l'acide fusidique prolonge les temps de prise initial (t_i) et final (t_f) du ciment. Cette augmentation est moins marquée pour le t_i , et indique que cet effet est dose-dépendant. Ainsi, le temps t_i qui est de 95 min pour le ciment de référence, est augmenté à 100 min, 105 min et 110 min, en présence de FA respectivement avec des doses de 3, 6 et 9 %. Une tendance similaire est notée pour le temps t_f : celui-ci est de 150 min pour CR et devient 180 min, 195 min et 200 min en présence de FA respectivement pour les doses de 3, 6 et 9 %. Cependant, l'introduction du fusidate de sodium s'accompagne d'une réduction du temps de prise initial et les variations sont d'autant plus marquées que la dose d'antibiotique est élevée. En effet, le temps t_i noté pour CR (95 min) est réduit à 80 min, 65 min et 50 min, suite à l'ajout de SF respectivement avec des doses de 3, 6, et 9%. La même tendance a été notée pour l'évolution du temps de prise final des ciments en présence de fusidate de sodium : le t_f déterminé pour CR, 150 min, est réduit en présence de SF à 125, 110 et 105 min, respectivement pour les doses 3, 6 et 9%.

Les résultats obtenus lors de l'ajout de l'antibiotique à la formulation du ciment montrent des variations du temps de prise et que cet effet est dose-dépendant. Ainsi, l'incorporation de FA sous forme solide prolonge sensiblement le temps de prise : pour une teneur en antibiotique de 9 %, l'augmentation est d'environ 16 % et 33 % respectivement pour t_i et t_f . Ces observations sont en accord avec les données rapportées dans la littérature. Généralement, l'introduction d'un antibiotique, dans la phase liquide ou solide lors de la formulation de divers ciments phosphocalciques, s'accompagne d'une augmentation du temps de prise : c'est le cas de la doxycycline [Canal et al., 2013], la kanamycine B [Kisanuki et al., 2007], la tétracycline [Ratier et al., 2004] et la céphalexine [Hesarakı et al., 2009]. Cet effet a été attribué par les auteurs à l'interaction du médicament avec la phase solide du ciment lors de la prise, ce qui retarde le processus de conversion des réactifs en phase apatitique.

Cependant, les résultats obtenus avec le fusidate de sodium montrent une tendance inverse. En effet, l'utilisation de SF solubilisé dans la phase liquide avec une dose de 9 %, réduit les temps de prise t_i et t_f du ciment respectivement de 47 % et 30 %. La différence de comportement entre le fusidate de sodium et l'acide fusidique vis-à-vis du temps de prise peut être expliquée sur la base de leur cinétique de réaction chimique. Les modifications du temps de prise engendrées par l'incorporation de l'antibiotique (SF ou FA) sont compatibles avec l'étude des cinétiques de la réaction chimique. En présence de SF, on assiste dans ce cas à la dissolution rapide des réactifs et à l'accélération de la formation de la phase apatitique,

comparé à la cinétique de la réaction chimique de prise du ciment de référence. Cette accélération du processus de conversion des réactifs en produits lors de l'élaboration du ciment pourrait être en grande partie responsable de la réduction du temps de prise. Dans le cas de FA, la cinétique de formation de l'apatite est analogue à celle du ciment de référence, tandis qu'un effet retardateur se manifeste pour le temps de prise. L'augmentation du temps de prise dans ce cas est attribuée, non seulement à l'acide fusidique lui-même, mais aussi à la quantité d'eau utilisée lors de la préparation du ciment. En effet, l'acide fusidique (FA) est introduit dans le ciment sous forme solide, et pour garder le même rapport L/S, la teneur en eau (phase liquide) est plus importante que celle utilisée dans le cas du ciment de référence et du ciment chargé en fusidate de sodium (Tableaux III-5 et III-6). Cette augmentation de la quantité en eau pourrait être en grande partie responsable de l'augmentation du temps de prise dans le cas du ciment avec FA. L'effet de l'augmentation du rapport L/S sur le temps de prise des ciments supporte cette hypothèse ; l'étude montre que lorsqu'on augmente la quantité d'eau dans le ciment son temps de prise augmente (cf. II-4-3-2).

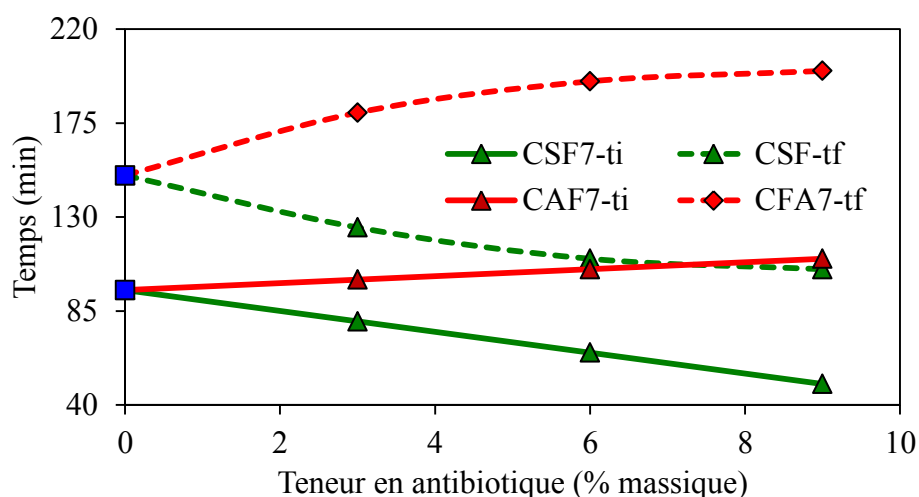


Figure III-25: Evolution du temps de prise initial et final en fonction de la dose et de la nature du principe actif introduit dans le ciment.

II-4-3-2- Influence du rapport L/S sur le temps de prise

L'évolution du temps de prise initial et final des ciments préparés avec différents rapports L/S (0,7 et 0,8) en fonction de la teneur en antibiotique (FA ou SF) incorporée est présentée sur la figure III-26. L'analyse des résultats obtenus indique un effet systématiquement retardateur du temps de prise des ciments (temps de prise initial et final) lorsque le rapport L/S augmente, et ce pour les différentes doses d'antibiotique étudiées. Des observations similaires quant à l'effet du rapport L/S sur le temps de prise ont été rapportés dans la littérature [Driessens et al., 2000 ; O'Hara et al., 2014 ; Canal et al., 2013].

Si l'on prend en considération le ciment préparé en présence de SF à 9 % (CSF 9%), le temps de prise noté pour t_i avec un rapport L/S = 0,7 est de 50 min ($t_i = 95$ min pour CR) et

celui obtenu pour $L/S = 0,8$ est de 65 min ($t_i = 100$ min pour CR) : on en déduit que l'augmentation du rapport L/S prolonge ainsi le t_i d'environ 30 % ; l'effet retardateur estimé pour le t_f est d'environ 24 % (t_f passe de 105 à 130 min lorsque L/S augmente de 0,7 à 0,8). Dans le cas du ciment préparé en présence de FA avec également la même dose en antibiotique (CFA 9%), les valeurs de t_i obtenues sont de 110 min et 145 min, respectivement pour L/S de 0,7 et 0,8 : soit une augmentation d'environ 32 %. Le temps de prise final noté dans ce cas est 200 min pour $L/S = 0,7$ et de 265 min pour $L/S = 0,8$ (soit une augmentation d'environ 33 %).

Dans tous les cas étudiés, on retrouve l'effet dose-dépendant retardateur de prise et de l'acide fusidique et dose-dépendant accélérateur de prise du fusidate de sodium et ce quel que soit le rapport L/S . Toutefois les évolutions de t_i et t_f ne suivent pas systématiquement les mêmes courbes de tendance pour L/S égal à 0,7 et à 0,8.

II-4-3-3- Influence de l'hydrogénophosphate de sodium sur le temps de prise

Compte tenu des temps de prise mesurés pour les formulations de ciments chargés en antibiotique qui sont relativement élevés par rapport aux exigences des chirurgiens, nous avons cherché à réduire le temps de prise des formulations de ciments chargés en antibiotique. Pour cela, nous avons étudié l'effet de l'introduction d'un accélérateur de prise connu, l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4), afin de mieux répondre au cahier des charges des chirurgiens. Ce composé, utilisé de manière empirique depuis plus de 20 ans, joue le rôle d'accélérateur de prise [Ginebra et al., 2012]. Cette étude a été réalisée avec des ciments élaborés avec un rapport L/S de 0,7 et pour des doses en antibiotique de 3, 6 et 9 %.

L'accélérateur de prise a été introduit dans la formulation du ciment sous forme d'une solution aqueuse de Na_2HPO_4 à 0,25 M ou 0,5 M qui a été utilisée en tant que phase liquide (Tableau III-7) à la place de l'eau classiquement utilisée pour préparer le ciment de référence. La figure III-27 présente la variation du temps initial (t_i) et du temps final (t_f) de prise du ciment chargé avec différentes doses d'antibiotique en fonction de la concentration d'accélérateur introduit dans la phase liquide. Comme on peut le voir pour toutes les formulations de ciments étudiées, l'introduction et l'augmentation de la concentration de Na_2HPO_4 ont pour effet une diminution du temps initial et final de prise. On note également qu'en présence de l'accélérateur, l'effet de la dose de l'antibiotique sur le temps de prise est beaucoup moins marqué qu'en l'absence d'accélérateur (Figure III-27). Enfin, il apparaît qu'entre les deux concentrations d'accélérateur de prise testées, l'effet est plus marqué sur le temps de prise final que sur le temps de prise initial. L'effet accélérateur de l'hydrogénophosphate de sodium sur la prise de ciments phosphocalciques (ciments à base d' α -TCP ou ciments brushitique) a également été rapporté dans la littérature [Khairoun al., 1997].

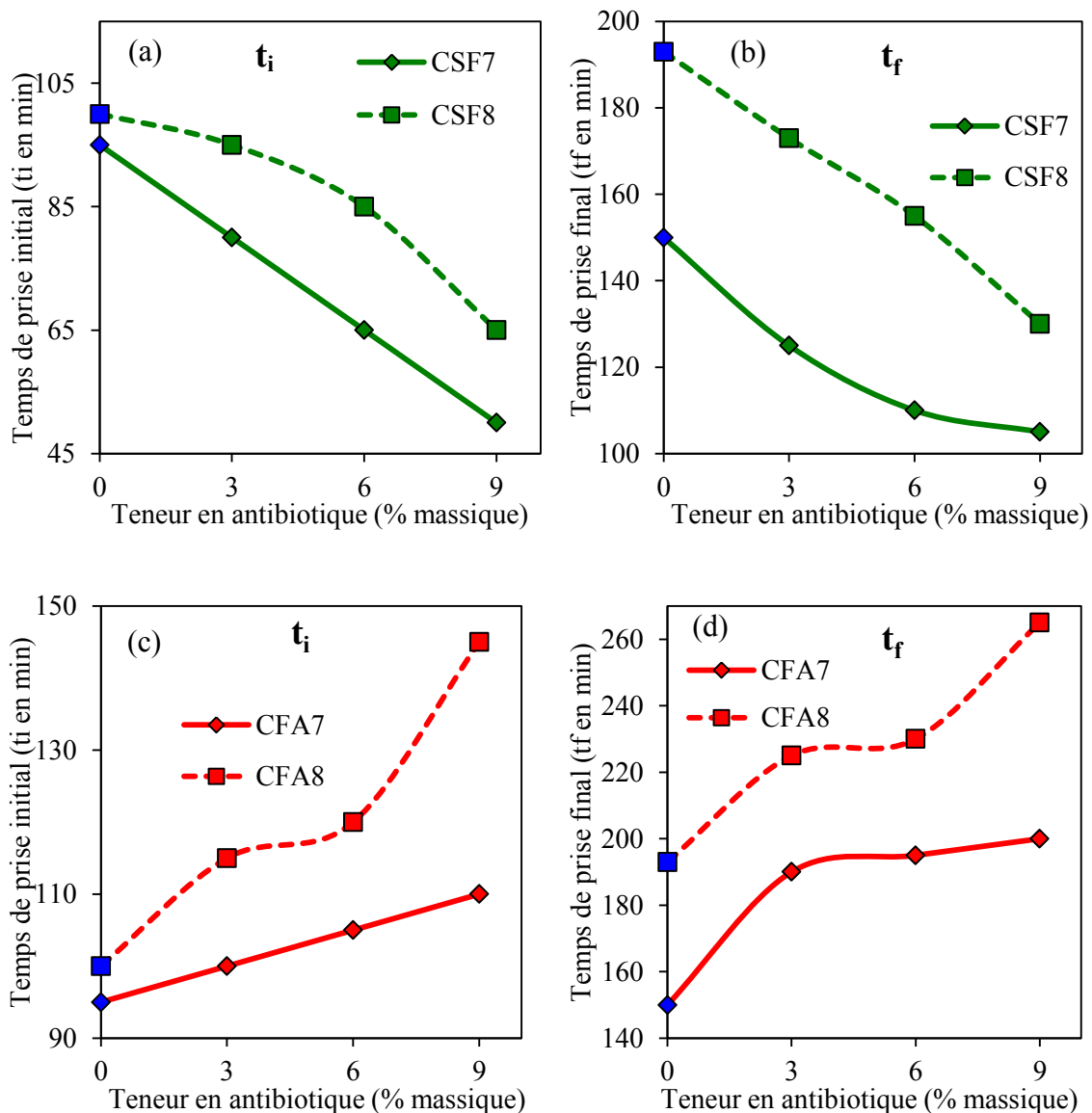


Figure III-26 : Evolution du temps de prise initial et final en fonction du rapport L/S ainsi que de la dose et du type d'antibiotique : ciments chargés en fusidate de sodium (a et b) ; ciments chargés en acide fusidique (c et d).

Tableau III-7 : Composition de la pâte d'un ciment de référence contenant différentes concentrations d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4 dissout dans la phase liquide).

Concentration de Na_2HPO_4 (M)	Phase Solide (S)		Phase Liquide (L)	
	Masse de brushite (g)	Masse de vaterite (g)	Masse d'eau (g)	Masse de Na_2HPO_4 (g)
0,25	0,5	0,5	0,7	0,035
0,5	0,5	0,5	0,7	0,070

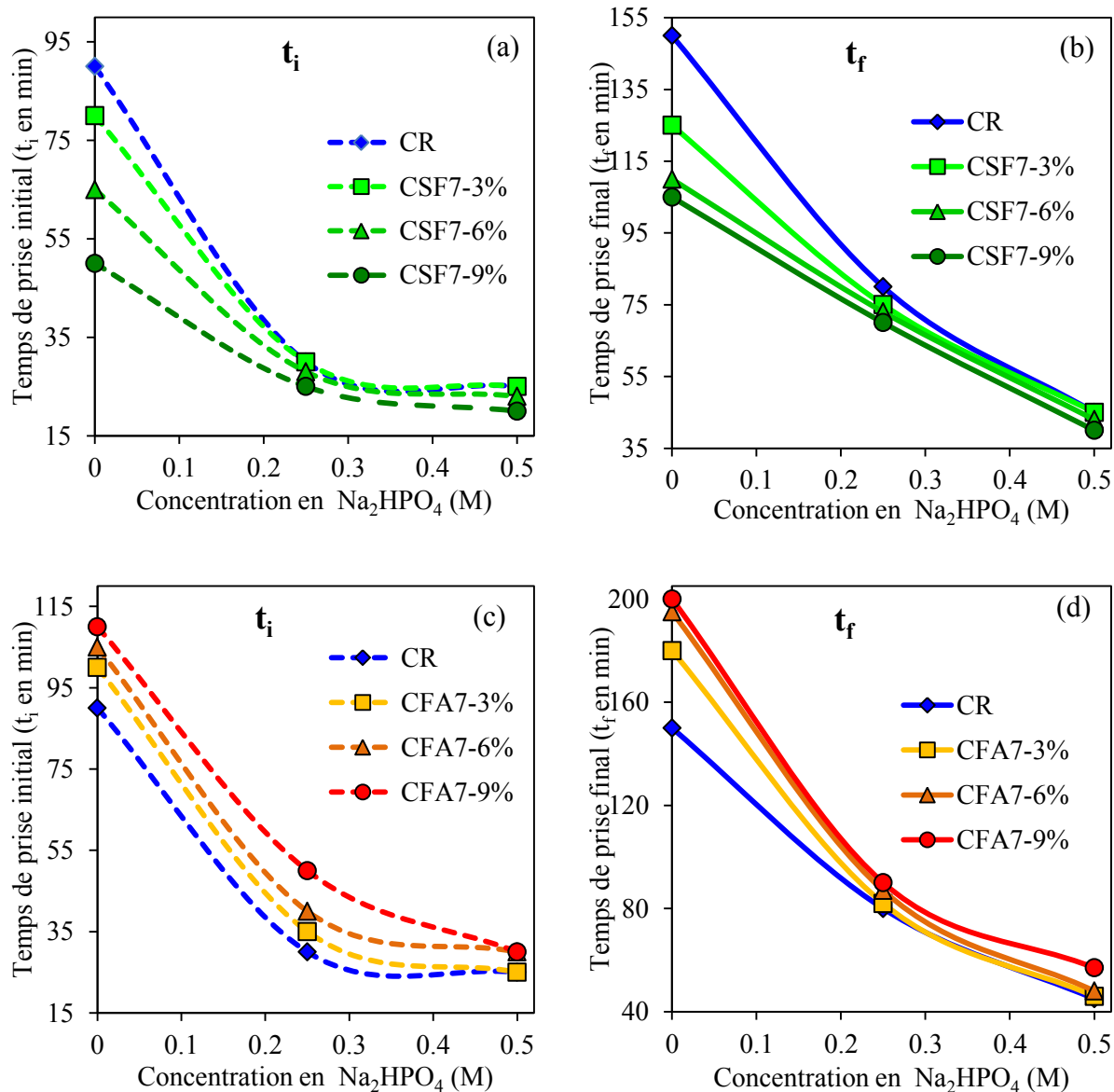


Figure III-27 : Evolution du temps de prise initial (t_i : (a) et (c)) et final (t_f : (b) et (d)) des ciments chargés avec différentes doses d'antibiotique en fonction de la dose de Na_2HPO_4 introduite dans la phase liquide du ciment: (a) et (b) correspondent aux ciments chargés en fusidate de sodium (CSF7) et (c) et (d) correspondent aux ciments chargés en acide fusidique (CFA7)

II-5- Etude de l'injectabilité de la pâte

Les ciments phosphocalciques ont la possibilité de se présenter sous forme d'une pâte. Cette forme permet, d'une part, une adaptation exacte de la géométrie de la cavité à combler et, d'autre part, l'utilisation en chirurgie qualifiée de « mini-invasive » en implantant le ciment à l'aide d'un dispositif muni d'un trocart et/ou d'une canule pour alléger l'acte chirurgical et limiter considérablement les risques d'infections post-opératoires. Pour ce faire, la pâte du ciment doit donc pouvoir être extrudée manuellement et facilement à l'aide de ce type de système : ceci relève de la notion d'injectabilité. Dans ce contexte, les tests expérimentaux ont été réalisés avec une seringue non munie d'une canule pour comparer l'influence de la composition de la pâte sur son injectabilité, tout en simplifiant au maximum les paramètres géométriques du dispositif qui sont d'une grande influence sur les résultats.

Dans cette étude, nous considérerons qu'un ciment est injectable si, 5 minutes après le mélange de la phase liquide avec la phase solide, la pâte peut être extrudée par l'application d'une force inférieure à 120 N (12 kg) ; cette force à appliquer est jugée comme la limite pour un chirurgien tout en restant homogène. L'absence de séparation des phases pendant l'extrusion est également importante à prendre en compte [Bohner 2010].

Nous présenterons dans cette partie les résultats de l'étude du ciment de référence et les problématiques associées, puis ceux obtenus avec les ciments chargés en antibiotique. L'influence de la nature et l'antibiotique et celle de la dose du principe actif seront discutées. Nous examinerons ensuite l'effet du rapport L/S sur l'injectabilité des ciments préparés.

II-5-2- Protocole expérimental

Le dispositif utilisé dans cette étude pour la mesure de l'injectabilité est un texturomètre (TAXT2, Stable Micro System®), associé à une table de commande (Stable Micro Systems) ; celui-ci enregistre en continu la charge nécessaire au déplacement du piston à une vitesse constante pour extruder une colonne de pâte de 15 mm de long (Figure III-28). Le protocole utilisé a été mis au point par Tadier. [Tadier et al., 2009]. Le ciment, une fois gâché, est mis en place dans une seringue (Terumo® 2,5 mL; surface intérieure 64 mm²; section de sortie de la seringue 3 mm²) ; celle-ci est placée sur une tablette adaptée au système de mesure, tel indiqué sur le schéma de la Figure III-28.

La mesure de l'injectabilité est lancée 5 minutes après le début du gâchage de la phase liquide avec la phase solide ; ce temps a été choisi comme pouvant correspondre au temps nécessaire au chirurgien pour préparer le ciment et l'introduire dans le dispositif permettant l'injection dans la cavité osseuse à combler. Au bout de ces 5 minutes, la mesure est lancée avec les conditions opératoires suivantes : le bras du texturomètre applique une force sur le piston de la seringue de manière à extruder la pâte en imposant un déplacement vertical du piston de 15 mm à une vitesse constante de 2 mm.s⁻¹.

Six compositions de ciment ont été étudiées :

- Ciment de référence
- Ciments incluant 3, 6 et 9 % de fusidate de sodium
- Ciments incluant 3 et 9 % d'acide fusidique

Pour chacune des compositions étudiées, trois essais ont été réalisés. Les résultats ont été exprimés graphiquement comme étant l'évolution de la force appliquée pour maintenir cette vitesse de 2 mm.s^{-1} , en fonction du déplacement de la colonne de pâte sur une hauteur de 15 mm dans le corps de la seringue. Les courbes présentent systématiquement un des profils d'injectabilité obtenus et l'écart-type issu de la moyenne des trois essais.

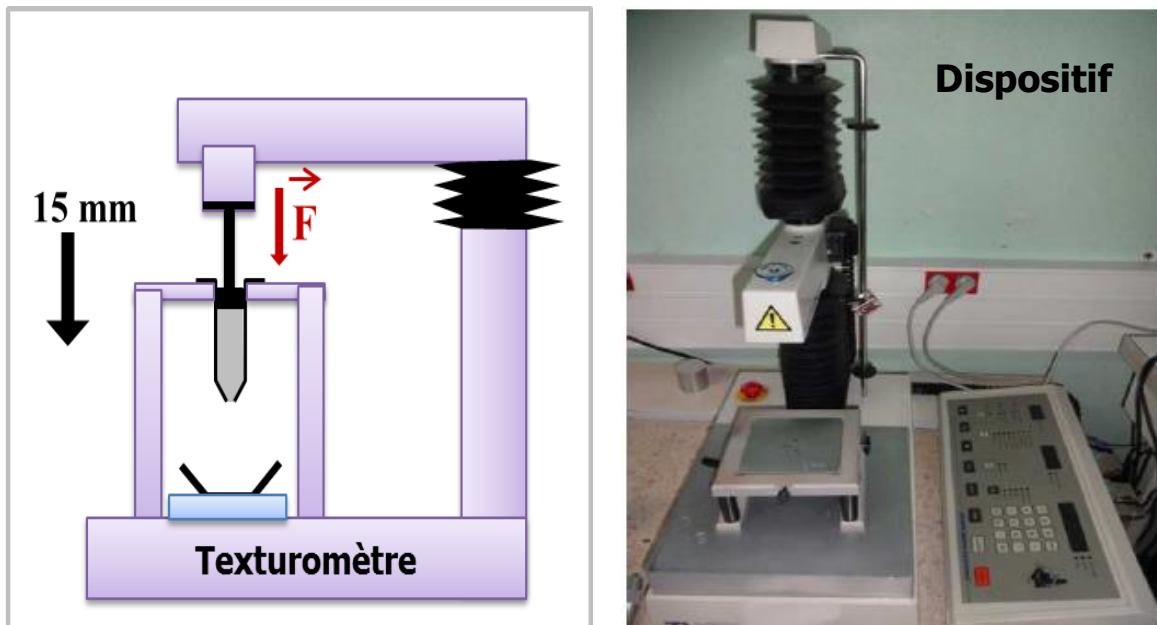


Figure III-28 : Schéma (a) et photographie (b) du dispositif expérimental utilisé pour les essais d'injectabilité

II-5-3- Résultats et discussion

II-5-3-1- Ciment de référence

La figure III-29 présente la courbe d'injectabilité de la pâte obtenue pour le ciment de référence. On note que la force d'extrusion augmente progressivement avec le déplacement du piston et la charge atteinte en bout de course du piston est d'environ 20 kg ; cette valeur est très élevée et ne permet pas d'envisager une extrusion manuelle de la pâte par le chirurgien. De plus la courbe croissante ainsi obtenue pour ce ciment est caractéristique de la présence d'un phénomène de séparation de phases (filter-pressing) ; celui-ci intervient lorsque la pression requise pour filtrer le liquide à travers les particules du ciment est inférieure à la pression nécessaire pour extruder la pâte [Bohner

et Baroud., 2005a]. Par conséquent ce phénomène entraîne une hétérogénéité de la composition de la pâte au fur et à mesure de son extrusion.

En effet, la séparation de phases se traduit par l'extrusion au début d'une pâte plus riche en phase liquide, soit une augmentation du rapport L/S de la pâte extrudée par rapport à la pâte initialement gâchée et introduite dans la seringue. Il en découle une accumulation de la phase solide restant dans le corps de la seringue au cours du déplacement du piston, ce qui rend ainsi de plus en plus difficile l'extrusion de cette pâte appauvrie en phase liquide.

L'utilisation du ciment en chirurgie mini-invasive se trouve confronté à deux problèmes majeurs en raison de ce phénomène séparation de phases : (i) la charge nécessaire pour extruder un tel ciment dépasse celle qu'un chirurgien est capable d'appliquer manuellement et (ii) la pâte extrudée est inhomogène et de composition non contrôlée en raison de la séparation de phases. Ce dernier phénomène reste le principal obstacle dans le cadre du développement industriel de ciments phosphocalciques injectables [Habib et al., 2010].

III-5-3-2- Influence de l'antibiotique sur l'injectabilité de la pâte

Les figures III-30 (a) et (b) présentent respectivement la courbe d'injectabilité du ciment de référence comparée à celles des ciments chargés en fusidate de sodium (CSF7-3 % et CSF7-9 %) et des ciments chargés en acide fusidique (CFA7-3%). Comme on peut le voir, la charge maximale pour extruder la pâte dans le cas des ciments chargés en acide fusidique (8 kg) et en fusidate de sodium (6 kg) est diminuée par rapport à celle du ciment de référence (20 kg). Ceci laisse penser que l'introduction de l'antibiotique dans le ciment améliore l'injectabilité de ce dernier et que cet effet est plus prononcé en présence de fusidate de sodium. La même tendance a été notée pour un ciment phosphocalcique associé à un autre antibiotique : le Cephalexin [Hesarki et al. 2009]. L'amélioration de l'injectabilité observée en présence du médicament pourrait être liée à son caractère lubrifiant, lequel permet aux particules solides de glisser les unes sur les autres rendant la pâte plus facile à extruder.

Comme nous l'avons noté, l'ajout du fusidate de sodium ou de l'acide fusidique a donc pour effet de rendre le ciment injectable. Bien que l'introduction de l'antibiotique réduise considérablement la charge nécessaire pour extruder la pâte, celle-ci augmente progressivement au cours de l'injection suite au phénomène de séparation de phases qui a été réduit mais pas supprimé par l'ajout de l'antibiotique.

II-5-3-3- Influence de la nature de l'antibiotique sur l'injectabilité de la pâte

L'effet de la nature de l'antibiotique sur l'injectabilité des pâtes préparées a été évalué sur des ciments chargés en fusidate de sodium et en acide fusidique, avec un taux en antibiotique de 3%. Les courbes obtenues (Figure III-31) montrent que le fusidate de sodium

améliore plus significativement l'injectabilité du ciment, comparé à l'acide fusidique. Cette différence de comportement entre les deux formes de l'antibiotique pourrait être liée à la grande solubilité du fusidate de sodium ; celle-ci se traduirait par l'augmentation de l'effet lubrifiant de la phase liquide et donc par conséquent faciliterait ainsi l'injectabilité de la pâte.

II-5-3-4- Influence du rapport L/S sur l'injectabilité de la pâte

Les courbes d'injectabilité obtenues avec des rapports L/S de 0,7 et 0,8 sont présentées sur la figure III-32. L'augmentation du rapport L/S se traduit par une amélioration de l'injectabilité des ciments préparés. En effet pour le ciment de référence, la charge maximale pour extruder la pâte est réduite de 20 kg à 14 kg lorsque le rapport L/S augmente de 0,7 à 0,8. La même tendance est notée pour les ciments chargés en antibiotique : en effet, pour les ciments chargés en acide fusidique et en fusidate de sodium à 3 %, la charge diminue de 14 à 6 kg et de 8 à 6 kg, respectivement. A noter en particulier que pour le ciment à 9% en fusidate de sodium, cette diminution est plus marquée (la charge passe de 7 à 2,5 kg pour un parcours de 15 mn). Ces observations sont en accord avec les données rapportées dans la littérature sur l'effet de L/S sur l'injectabilité de ciments minéraux [Khairoun et al., 1998; Bohner et al., 2005a ; Dunne et al., 2011 ; O'Hara et al., 2014].

Dans tous les cas examinés, on assiste à une amélioration de l'injectabilité avec l'augmentation du rapport L/S. Il est à noter que les courbes d'injectabilité obtenues pour le ciment de référence et les ciments chargés à 3 % en fusidate ou en acide fusidique montrent un profil croissant de la charge appliquée en fonction du déplacement ; cette observation atteste de la présence du phénomène de séparation de phase dans ces cas. Cependant, l'allure de courbe d'injectabilité du ciment chargé en fusidate de sodium (9 %) avec un rapport L/S de 0,8 (CSF8-9 %) montre une tendance à la saturation (formation de plateau) ; le faible accroissement de la charge en fonction du parcours atteste de l'absence du phénomène de séparation de phase dans ce cas. Ainsi, les ciments chargés avec 9% de fusidate présentent une meilleure injectabilité, comparée aux autres ciments examinés.

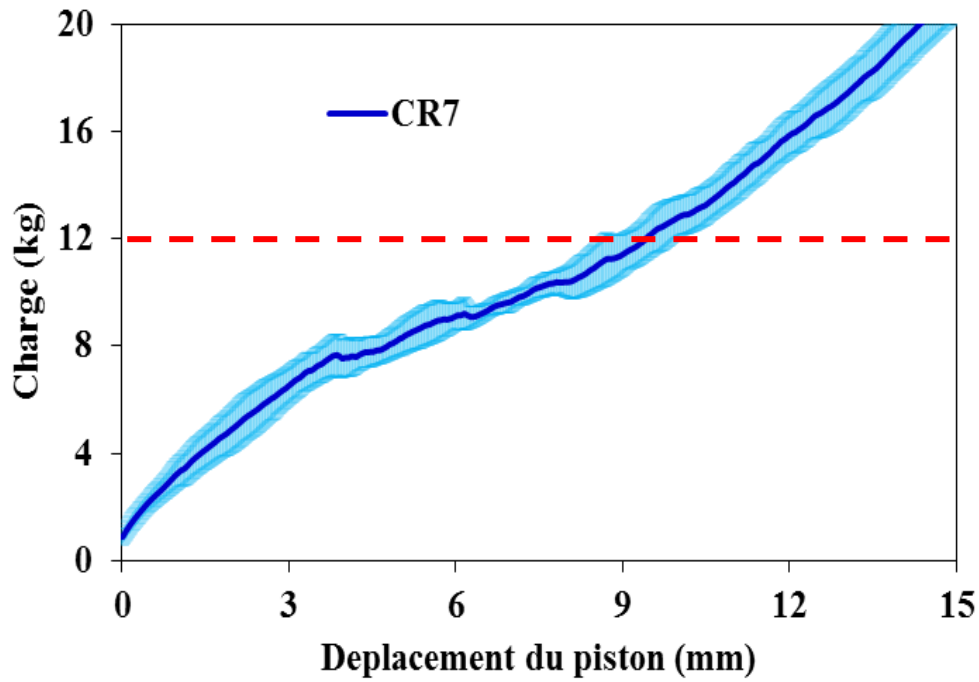


Figure III-29 : Courbe d'évaluation de l'injectabilité du ciment de référence.

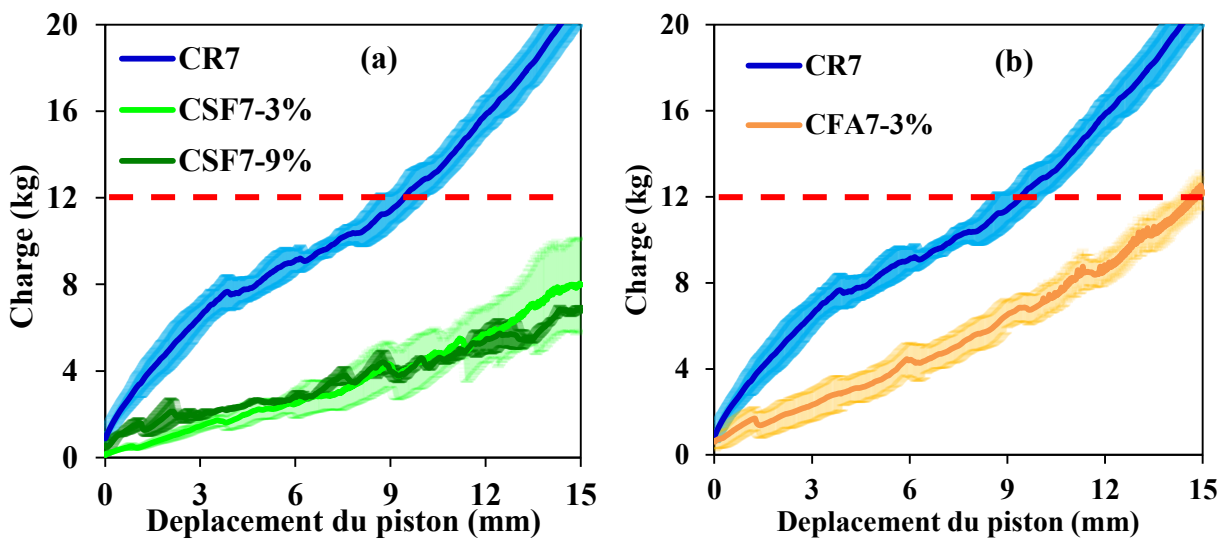


Figure III-30 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de la pâte de ciments préparés :
 (a) Ciment de référence comparé aux ciments chargés en fusidate à 3 % (CSF7-3%) et à 9 % (CSF7-9%) ;
 (b) Ciment de référence comparé au ciments chargés avec 3% d'acide fusidique (CFA7-3%).

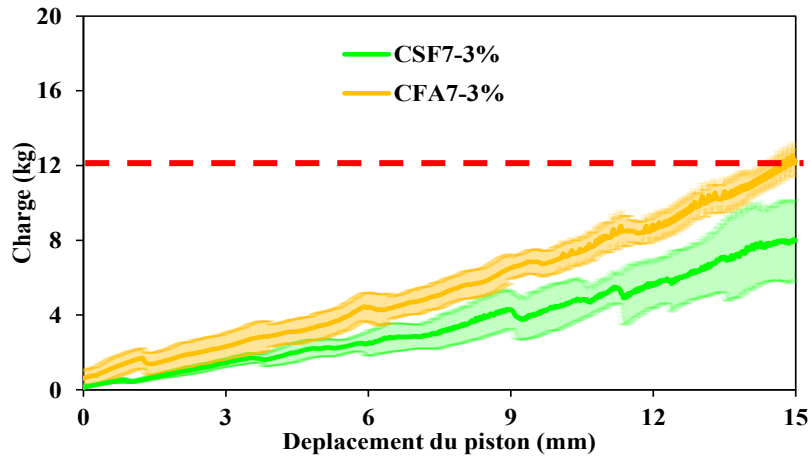


Figure III-31 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de la pâte de ciments chargés en fusidate (CSF7-3%) et en acide fusidique (CFA7-3%).

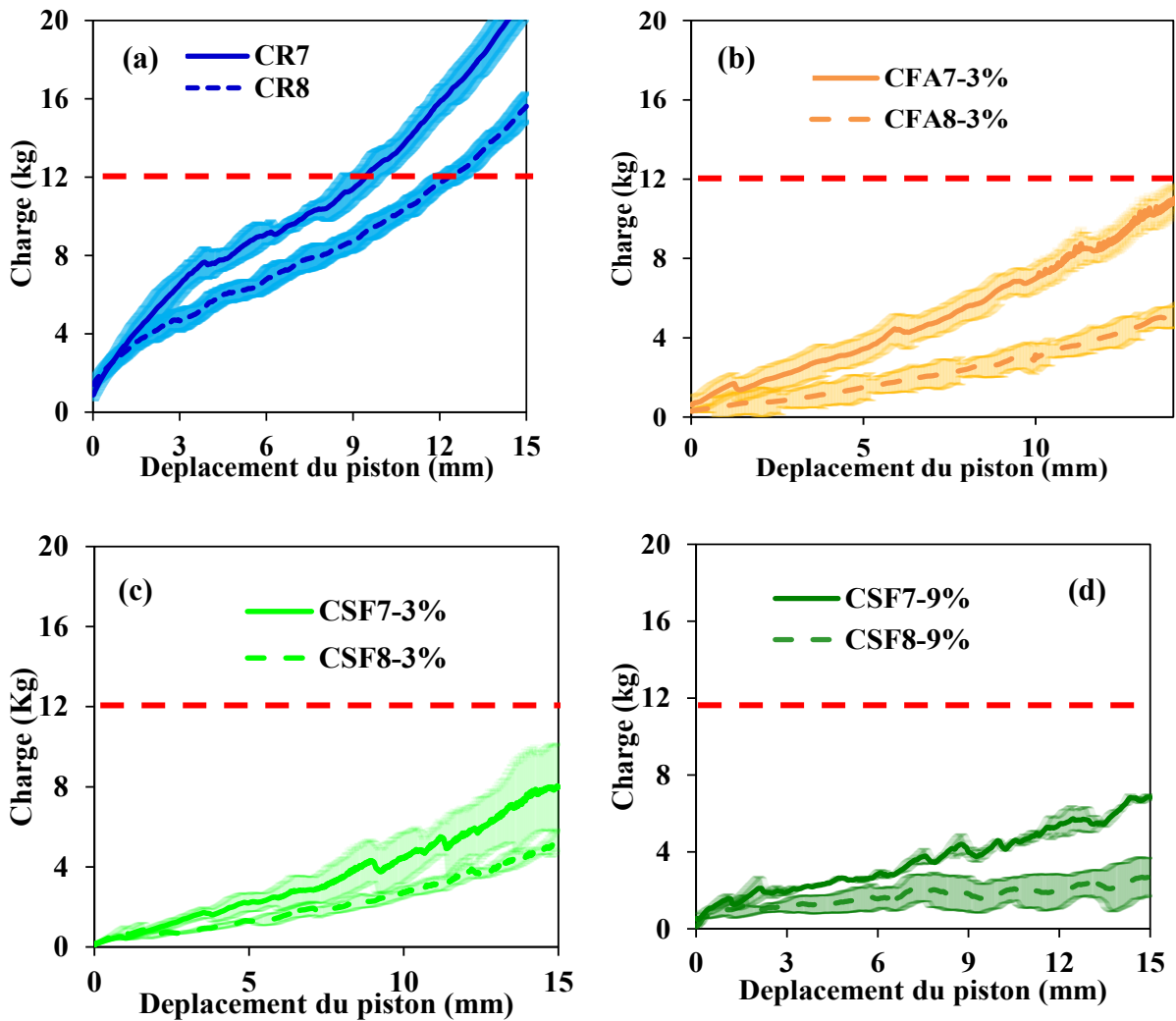


Figure III-32 : Courbes d'évaluation de l'injectabilité de la pâte de ciments élaborée avec des rapports L/S de 0,7 et de 0,8 et avec différentes doses d'antibiotique : ciments de référence (a), ciments chargés en acide fusidique à 3 % (b) et ciments chargés en fusidate de sodium à 3 % (c) et 9 % (d).

II-6- Porosité du ciment

La porosité du ciment est un facteur clé, car elle affecte non seulement les propriétés mécaniques du ciment (la résistance du ciment diminue lorsque la porosité augmente) mais aussi ses propriétés biologiques. La taille des pores en particulier, ainsi que l'interconnexion des pores affectent l'activité cellulaire. Une forte porosité conduit à des propriétés mécaniques faibles des ciments phosphocalciques pour le comblement et la régénération osseuse, cependant, cela permet la pénétration des fluides biologiques et des cellules menant à une bonne résorption et à une croissance de l'os néoformé plus rapide [Woodard et al., 2007]. Les ciments phosphocalciques sont intrinsèquement microporeux ; la porosité dépend notamment du rapport L/S (plus ce rapport est grand, plus la taille des pores augmente) [O'Hara et al., 2014]. Il convient de noter la différence entre la notion de la macroporosité et microporosité dans le domaine de biomatériaux et celle utilisée selon l'UPAC dans la physicochimie des solides poreux. Dans le cas de biomatériaux, on parle de macroporosité lorsque la taille de pores est supérieure à 100 μm et de microporosité lorsque celle-ci est inférieure à 10 μm [Autefage, 2009].

II-6-1- Effet de la présence d'antibiotique sur la porosité du ciment

Les mesures de la porosité des ciments ont été réalisées à l'aide d'un porosimètre à mercure (Autopore 94XX, Micromeritics®). Les ciments élaborés pour cette étude ont été préparés avec un rapport L/S égal à 0,7. Trois doses (3, 6 et 9 %) ont été testées pour le ciment chargé en fusidate de sodium, tandis qu'une seule dose (3 %) a fait l'objet d'une étude pour le ciment chargé en acide fusidique. Une seule mesure de porosité a été réalisée pour chaque composition. Les courbes de distribution de la taille des pores des ciments préparés (Figure III-33) mettent en évidence la présence de deux types de porosité (distribution bimodale de la taille de pores) : la première famille de pores qui est située entre 5 μm et 70 μm et représente un volume poreux très faible ($\leq 4\%$), avec une taille moyenne de pores allant de 10 μm à 45 μm ; la seconde famille est située entre 5 et 300 nm avec une taille moyenne de pores comprise entre 10 nm et 20 nm.

Les valeurs de porosité obtenues sont reportées dans le tableau III-8. En général, la présence du principe actif dans le ciment diminue sa porosité. En effet, l'introduction de l'acide fusidique à 3 % réduit la porosité totale d'environ 8 % (la porosité passe de 78 % pour CR à 70 % pour CFA 3%). Dans le cas du fusidate de sodium, la porosité est diminuée d'environ 9 %, 12 % et 14 %, respectivement pour les ciments CSF3%, CSF6% et CSF9%.

Dans le cas de l'acide fusidique qui est peu soluble, la diminution de porosité notée (8%) pourrait être liée au fait que la quantité introduite reste essentiellement sous forme solide et est emprisonnée dans les pores du ciment. Pour le fusidate de sodium solubilisé dans l'eau (phase liquide), l'évolution de la porosité peut s'expliquer par la quantité d'eau disponible à

l'intérieur du ciment qui diminue au cours de la réaction de prise, ce qui pourrait induire la précipitation du fusidate de sodium lorsque sa limite de solubilité sera atteinte. Celui-ci précipiterait alors dans les pores de plus petite taille (environ 15 nm) jusqu'à les saturer puis viendrait ensuite se déposer à la surface des cristaux apatitiques

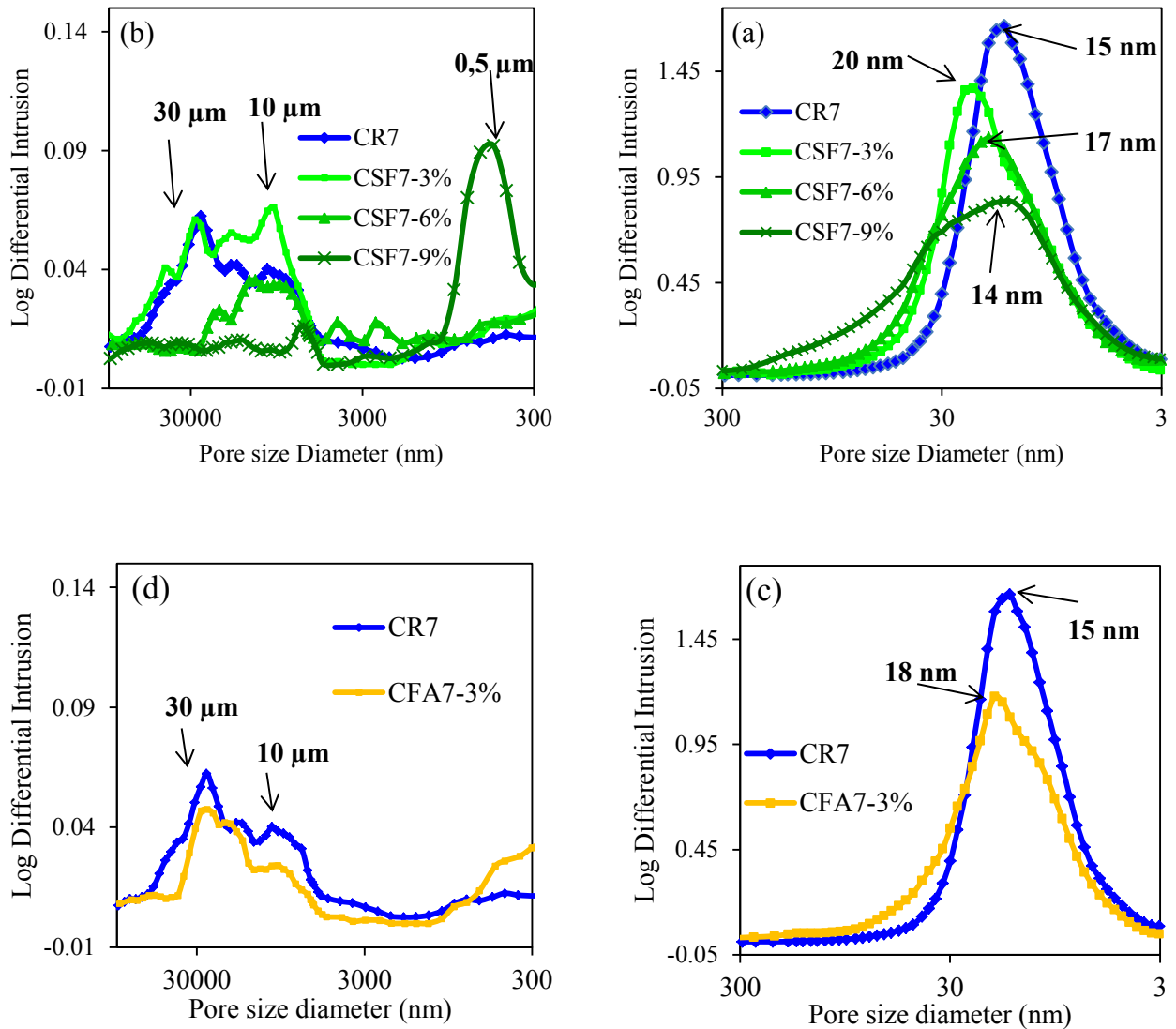


Figure III-33 : Courbes de distribution de taille des pores des différents ciments préparés : (a et b) ciments incluant différents teneurs en fusidate de sodium, (c et d) ciments incluant 3% d'acide fusidique.

II-6-2- Effet du rapport L/S sur la porosité

L'influence du rapport L/S sur la porosité a été étudiée avec les ciments en absence et en présence du principe actif (FA et SF), avec des doses de 3, 6 et 9%. Les courbes de distribution de la taille des pores obtenues avec des rapports L/S de 0,7 et 0,8 montrent la même tendance pour tous les ciments examinés. Pour cela, seules des courbes représentatives des ciments étudiés (ciments chargés avec 3 % en antibiotique) ont été présentées sur la figure III-34.

Dans tous les cas examinés, on observe une distribution bimodale de la taille de pores, similaire à celle décrite précédemment (II-6-1-1) ; toutefois, la microporosité notée pour les ciments élaborés avec $L/S = 0,8$, représente environ 10 %. L'augmentation du rapport L/S entraîne une augmentation du diamètre des pores. En effet, lorsque le rapport L/S croît de 0,7 à 0,8, le diamètre des pores passe de 15 nm à 20 nm pour le ciment de référence ; ces augmentations sont de 18 à 25 nm et de 20 à 21 nm respectivement pour les ciments chargés avec 3% d'acide fusidique ou de fusidate de sodium.

Les valeurs de porosité obtenues en fonction du rapport L/S pour les ciments étudiés sont reportées dans le tableau III-9. L'augmentation de la quantité d'eau utilisée (L/S passe de 0,7 à 0,8) nécessaire pour l'élaboration des ciments accroît la porosité de 8% pour CR, de 10 % pour CFA3% et de 9%, 10% et 6% respectivement pour les ciments CSF3%, CSF6% et CSF9%. L'augmentation de la porosité avec le rapport L/S a également été notée pour les ciments phosphocalciques associés à des principes actifs [Canal et al., 2013 ; Ginebra , 2008 ; O'Hara et al., 2014].

Tableau III-8 : Porosité totale et microporosité (% v /v) pour le ciment de référence (CR) et les ciments chargés en acide fusidique (CFA7) ou en fusidate de sodium (CSF7).

Ciment	CR7	CFA7	CSF7		
			3	6	9
Antibiotique (%)	0	3	3	6	9
Porosité totale (%) [5 nm - 300 µm]	74	71	69	66	64
Microporosité (%) [5 nm - 2 µm]	70	68	65	63	60

Tableau III-9 : Effet du rapport L/S sur la porosité des ciments préparés : ciments chargés en fusidate de sodium (CSF) ou en acide fusidique (CFA).

Ciment	L/S	Porosité totale (%) [5 nm-300 µm]	Microporosité (%) [5 nm - 2 µm]
CR	0,7	74	70
	0,8	82	78
CFA3%	0,7	71	68
	0,8	80	74
CSF3%	0,7	69	65
	0,8	78	67
CSF6%	0,7	66	63
	0,8	76	69
CSF9%	0,7	64	60
	0,8	70	64

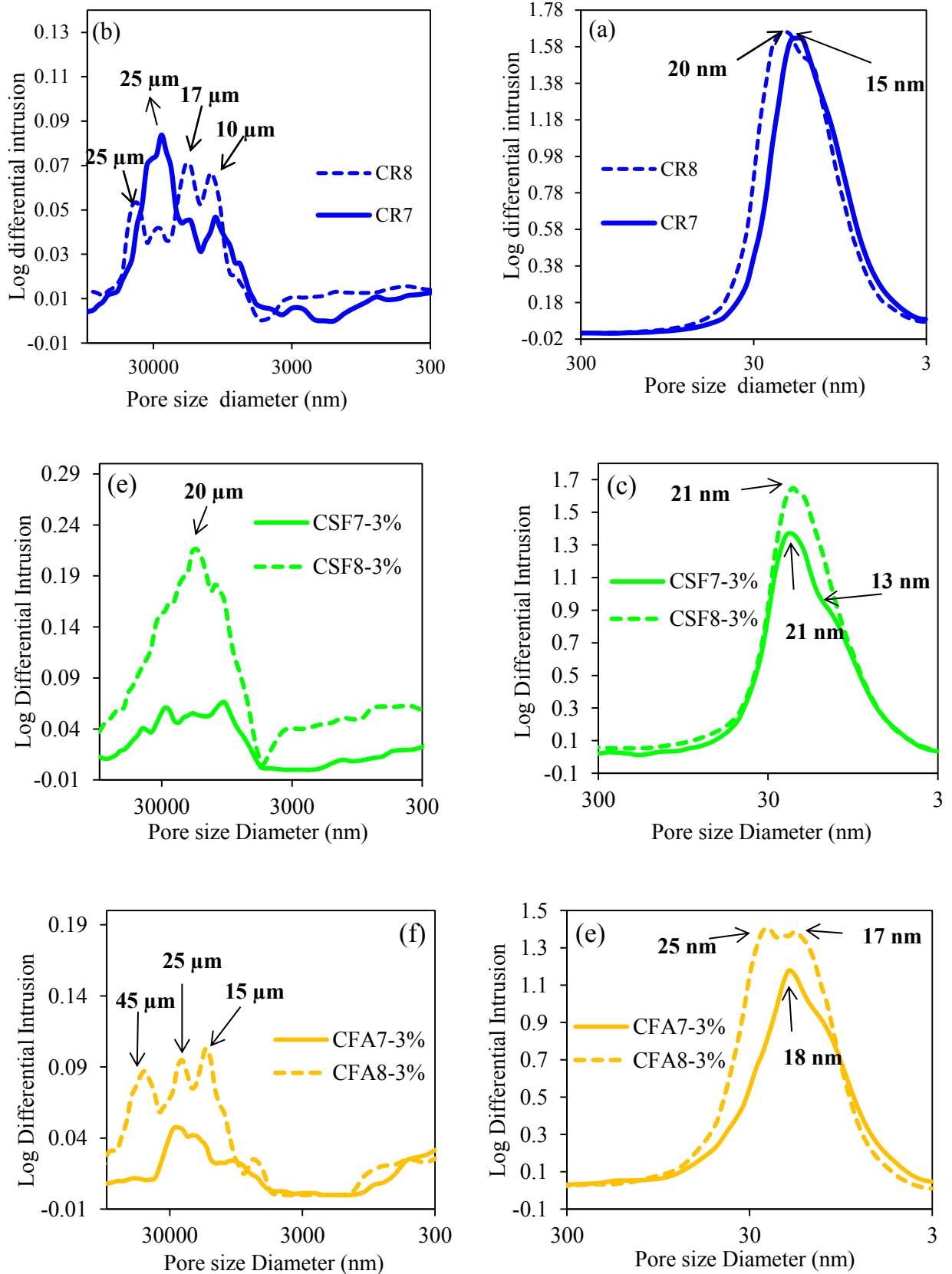


Figure III-34 : Effet du rapport L/S sur la distribution de la taille des pores des ciments préparés : (a et b) ciment de référence, (c et d) ciment incluant 3 % de fusidate de sodium et (e et f) ciment incluant 3% d'acide fusidique.

II-7- Etude des propriétés mécaniques

Même si les ciments phosphocalciques sont destinés à combler de petits défauts osseux dans des zones peu sollicitées mécaniquement, il est toutefois important de caractériser leurs propriétés mécaniques et en particulier leur résistance en compression dans des conditions si possibles les plus proches possibles des conditions *in vivo*. Il est en particulier important que ces matériaux présentent de bonnes propriétés mécaniques afin d'éviter leur délitement ou défaillance après l'opération chirurgicale.

Comme nous l'avons mentionné précédemment le ciment étudié prend grâce à un processus de dissolution-précipitation qui crée un réseau de cristaux enchevêtrés d'apatite nanocristalline qui confère aux ciments leurs propriétés mécaniques. Les cristaux d'apatite croissent et le réseau devient de plus en plus dense jusqu'à ce que le ciment atteigne ses propriétés mécaniques maximales. Ces dernières dépendent intimement de la microstructure du ciment telle que la porosité ainsi que de la quantité, la taille, la morphologie et la distribution des cristaux d'apatite formés. La porosité est le facteur influençant le plus les propriétés mécaniques des ciments. En ce qui concerne les matériaux utilisés en tant que substituts osseux, leurs propriétés mécaniques sont évaluées le plus souvent en compression.

Plusieurs études ont montré aussi que l'introduction d'un antibiotique dans un ciment a un effet sur leurs propriétés mécaniques ; toutefois les auteurs rapportent qu'en général les faibles concentrations d'antibiotique ne changent pas d'une manière significative la résistance à la compression [Joosten et al., 2004 ; Hofmann et al., 2009] alors qu'elles ont tendance à la diminuer en présence de concentrations plus élevées d'antibiotique [Ratier et al., 2004; Ratier et al., 2001; Kisanuki et al., 2007; Alkhraisat et al., 2010]. Cette diminution de la résistance en compression peut être attribuée à différents facteurs, tels que l'augmentation de la porosité ou à une certaine inhibition de la réaction de prise [Canal et al., 2011].

Dans cette partie du chapitre nous étudierons dans un premier temps l'effet de l'incorporation de fusidate de sodium ou d'acide fusidique ainsi que du rapport L/S sur les propriétés mécaniques du ciment sec, et dans un second temps nous étudierons l'effet de la maturation de ces mêmes ciments dans une solution de NaCl 0,9% (m/m) sur leurs propriétés mécaniques du ciment humide.

II-7-1- Propriétés mécaniques des ciments secs

II-7-1-1- Protocole expérimental

II-7-1-1-1- Test de résistance à la compression

L'essai de compression consiste à soumettre une éprouvette de ciment de forme cylindrique à deux forces axiales opposées, en la plaçant entre les plateaux d'une presse. La déformation du matériau en fonction de l'effort de compression est enregistrée en continu par un appareil de type Hounsfield Série S (cf. Annexe).

II-7-1-1-2- Préparation des échantillons

Après 3 min de gâchage, la pâte du ciment est placée dans des moules de forme cylindrique de 10 mm de diamètre et 20 mm de hauteur, en tassant celle-ci pour éliminer au mieux toutes les bulles d'air qui pourraient rester piégées au sein de la pâte. Le moule est ensuite placé dans une atmosphère saturée en eau et à l'étuve à 37°C pendant 48 h. Une fois le ciment durcit, il est séché pendant une semaine supplémentaire à l'étuve à 37°C, puis démoulé et séché encore une semaine à l'étuve à 37°C.

Trois formulations de ciments ont été étudiées pour les essais mécaniques : ciment de référence, ciments chargés avec le fusidate de sodium (CSF), et ciments chargés avec de l'acide fusidique (CFA) à différentes teneurs en principe actif (3, 6 et 9% m_{SF}/m_S ou m_{FA}/m_S). Trois essais ont été effectués pour chaque formulation de ciment étudiée.

II-7-1-2- Résultats et discussion

II-7-1-2-1- Influence de l'antibiotique sur les propriétés mécaniques

L'influence de l'incorporation de l'antibiotique sur la résistance à la compression a été examinée sur les ciments préparés avec un rapport L/S de 0,7 et chargés avec différentes doses de principe actif. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III-10. L'introduction du fusidate de sodium dans le ciment ainsi que l'augmentation de sa concentration n'ont pas d'effet significatif sur la résistance à la compression du ciment élaboré ; ainsi, la valeur notée pour CR (12 MPa) est proche de celle des ciments CSF3% (10 MPa), CSF6% (9 MPa), et CSF9% (10 MPa). En outre, la dose d'antibiotique ne semble pas affecter la résistance à la compression. Dans le cas des ciments chargés avec l'acide fusidique, on observe une diminution de la résistance en compression relativement marquée pour les ciments CFA3% (6 MPa) et CFA6% (7 MPa), comparés au ciment de référence (12 MPa). Cette différence est moins marquée pour la dose plus élevée de FA (10 MPa pour CFA9%)

Bien que nous ayons déjà vu que l'introduction de l'antibiotique diminue légèrement la porosité totale du ciment (cf Tableau III-10), aucune augmentation de la résistance à la compression des ciments n'a été notée. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature : en général, les propriétés mécaniques des ciments phosphocalciques ont tendance à diminuer en présence d'antibiotiques [[Canal et al., 2013](#) ; [Ratier et al., 2004](#) ; [Alkhraisat et al., 2010](#)].

Notons que la résistance en compression du ciment de référence (12 ± 1 MPa) et du ciment qui contient le fusidate de sodium (10 ± 1 MPa), est supérieure à celle rapportée dans la littérature pour l'os trabéculaire (9 ± 1 MPa) [[Carter et Hayes, 1977](#)].

Tableau III-10 : Résistance à la compression pour les différentes formulations de ciment étudiées avec $L/S = 0,7$ en fonction du pourcentage en principe actif.

	CSF7	CFA7
Antibiotique (%)	Contrainte (MPa)	Contrainte (MPa)
0	12 ± 1	12 ± 1
3	10 ± 1	6 ± 2
6	9 ± 3	7 ± 1
9	10 ± 1	10 ± 1

II-7-1-2-2- Influence du rapport L/S sur les propriétés mécaniques

La figure III-35 présente la résistance à la compression du ciment de référence et du ciment incluant du fusidate de sodium, préparés avec différents rapports L/S. En augmentant le rapport L/S, la résistance en compression a été réduite de manière significative ; cette diminution est de 11 à 4 MPa dans le cas du ciment de référence et de 9 à 4 MPa dans le cas du ciment chargé en fusidate de sodium. Cette diminution est à relier à l'augmentation de la porosité des ciments avec l'augmentation du rapport L/S. Ces observations sont en accord avec les données rapportées dans la littérature [Canal et al., 2013 ; O'Hara et al., 2014].

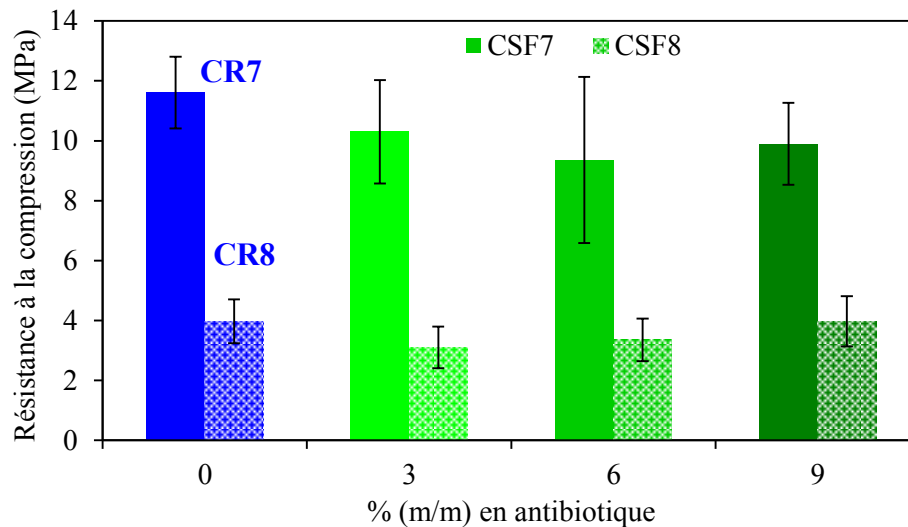


Figure III-35 : Effet du rapport L/S sur la résistance à la compression du ciment de référence et du ciment chargé avec différentes teneurs en fusidate de sodium.

II-7-2- Propriétés mécaniques des ciments humides

Il est à noter que lors de l'implantation dans le corps humain, les substituts osseux seront en contact avec les fluides biologiques. Le ciment se trouvera alors dans un état humide. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la résistance à la compression des ciments après différents temps de maturation en milieu humide. Nous avons dû dans un premier temps établir un protocole pour réaliser ces tests.

II-7-2-1- Protocole expérimental

Des éprouvettes cylindriques de ciment (10 mm de diamètre et 20 mm de hauteur) ont été préparées avec un rapport L/S égal à 0,7 et à 0,8 dans des moules en silicone, puis laissées mûries durant 1h30 dans une enceinte climatique à 37°C et à 95 % d'humidité relative. Ensuite le ciment encore dans son moule est immergé dans une solution de NaCl (0,9% m/m) à 37 °C pendant différentes périodes (6, 12, 24, 48 et 72h) : les deux extrémités du ciment encore dans son moule (surfaces à la base et en haut du moule cylindrique) sont alors en

contact avec la solution, puis au bout du temps choisi le ciment est sorti de la solution, démoulé puis simplement séché avec du papier absorbant. Les propriétés mécaniques des différentes éprouvettes sont évaluées immédiatement après démoulage et séchage avec le papier. Trois échantillons ont été testés pour chaque temps et formulation testés.

II-7-2-2- Résultats et discussion

L'évaluation de la résistance à la compression des ciments après différents temps de maturation en milieu humide (solution saline de NaCl (0,9 % m/m)) a été réalisée sur le ciment de référence et des ciments chargés en fusidate de sodium (3%, 6% et 9%) et en acide fusidique (3% et 9%), et ce pour deux valeurs du rapport L/S (0,7 et 0,8). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure III-36.

Pour tous les systèmes examinés, on note que la résistance à la compression augmente progressivement en fonction du temps de maturation des ciments et semble se stabiliser après une durée de 24 h. D'après l'étude cinétique de la réaction de prise des ciments étudiés (chapitre III-B, paragraphe III-2), ce temps correspond à la formation d'environ 95 % de l'apatite.

L'introduction de l'antibiotique dans les ciments entraîne une diminution de la résistance à la compression du matériau, et ce quel que soit le rapport L/S utilisé. Dans le cas de l'acide fusidique, cette régression est d'environ 50 % (5,6 MPa pour CR7 contre 2 et 2,6 respectivement pour CFA7-3% et CFA7-9%). En outre, la dose de FA ne semble pas avoir un effet significatif sur la résistance à la compression pour les deux rapports L/S étudiés. L'incorporation du fusidate de sodium dans les ciments humides n'entraîne pas de modification assez significative de la résistance à la compression pour les doses et les rapports L/S utilisés.

L'influence du rapport L/S sur la résistance à la compression des ciments maturés en milieu humide a été réalisée avec des ciments chargés en antibiotique à différentes doses (Figure III-37). Contrairement à l'effet noté pour les ciments secs (paragraphe II-7-1-2-2), l'élévation du rapport L/S ne semble pas avoir d'effet significatif sur la résistance à la compression des ciments étudiés.

L'étude comparée des résultats obtenus pour les ciments préparés en milieu humide et ceux préparés en milieu secs (paragraphe II-7-1-2-1) est présentée sur la figure III-38. Pour un rapport L/S de 0,7, la résistance à la compression des ciments immergés dans NaCl diminue au moins d'un facteur deux par rapport à celle des ciments secs, et ce quel que soit le type de ciment examiné (CR, CSF et CFA) et la dose incorporée (3, 6 ou 9%). Cependant, les résultats obtenus avec le rapport L/S de 0,8 donne une tendance inverse pour le ciment de référence ; les ciments chargés en antibiotique avec différentes doses ne montrent pas de différences de la résistance à la compression.

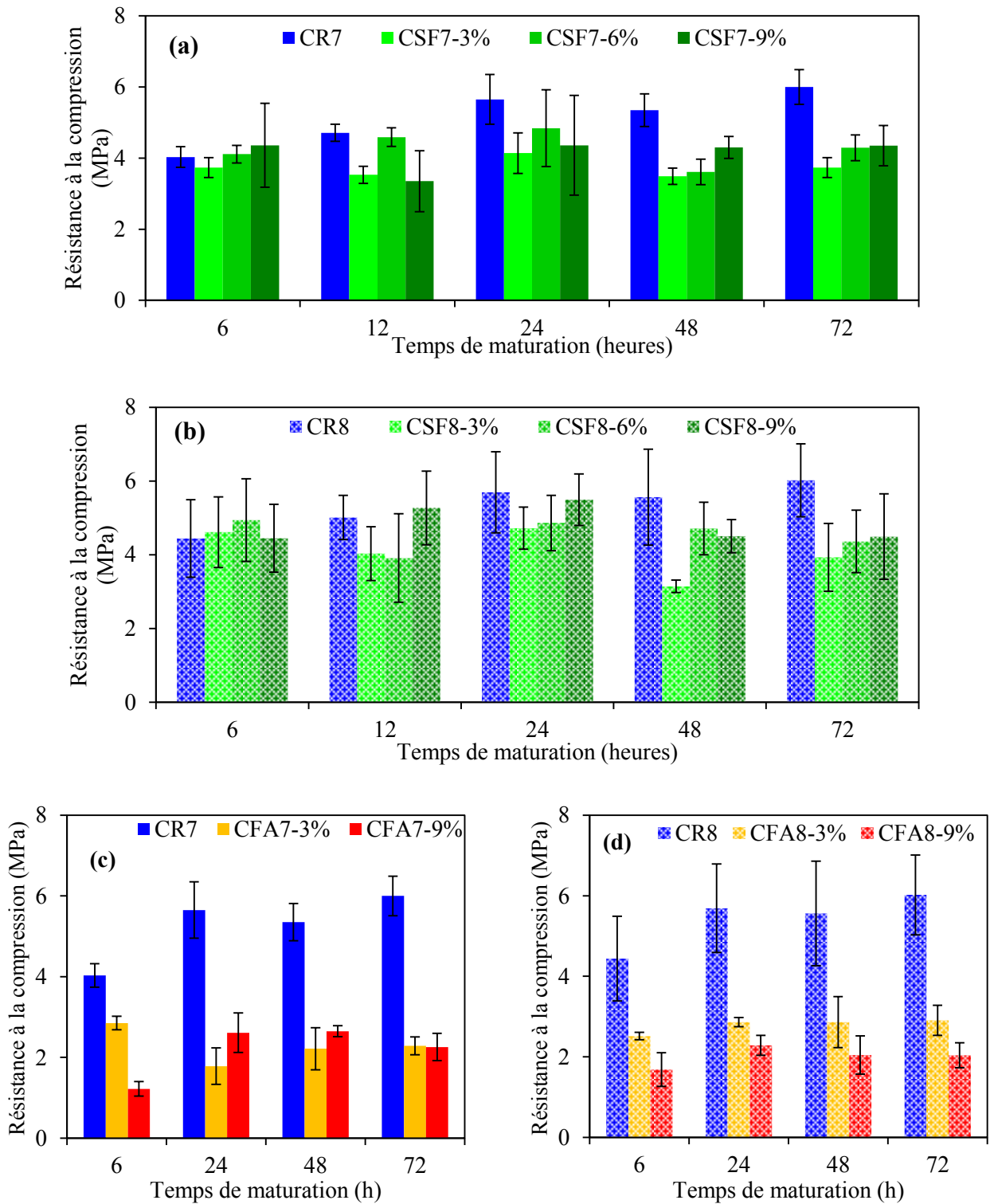


Figure III-36 : Effet de la dose d'antibiotique sur la résistance à la compression des ciments humides en fonction du temps de maturation du ciment dans la solution de NaCl : a et b correspondent au ciment de référence comparé aux ciments chargés en fusidate de sodium, respectivement pour les rapports L/S = 0,7 et 0,8 ; c et d correspondent au ciment de référence comparé aux ciments chargés avec l'acide fusidique respectivement pour les rapports L/S = 0,7 et 0,8 .

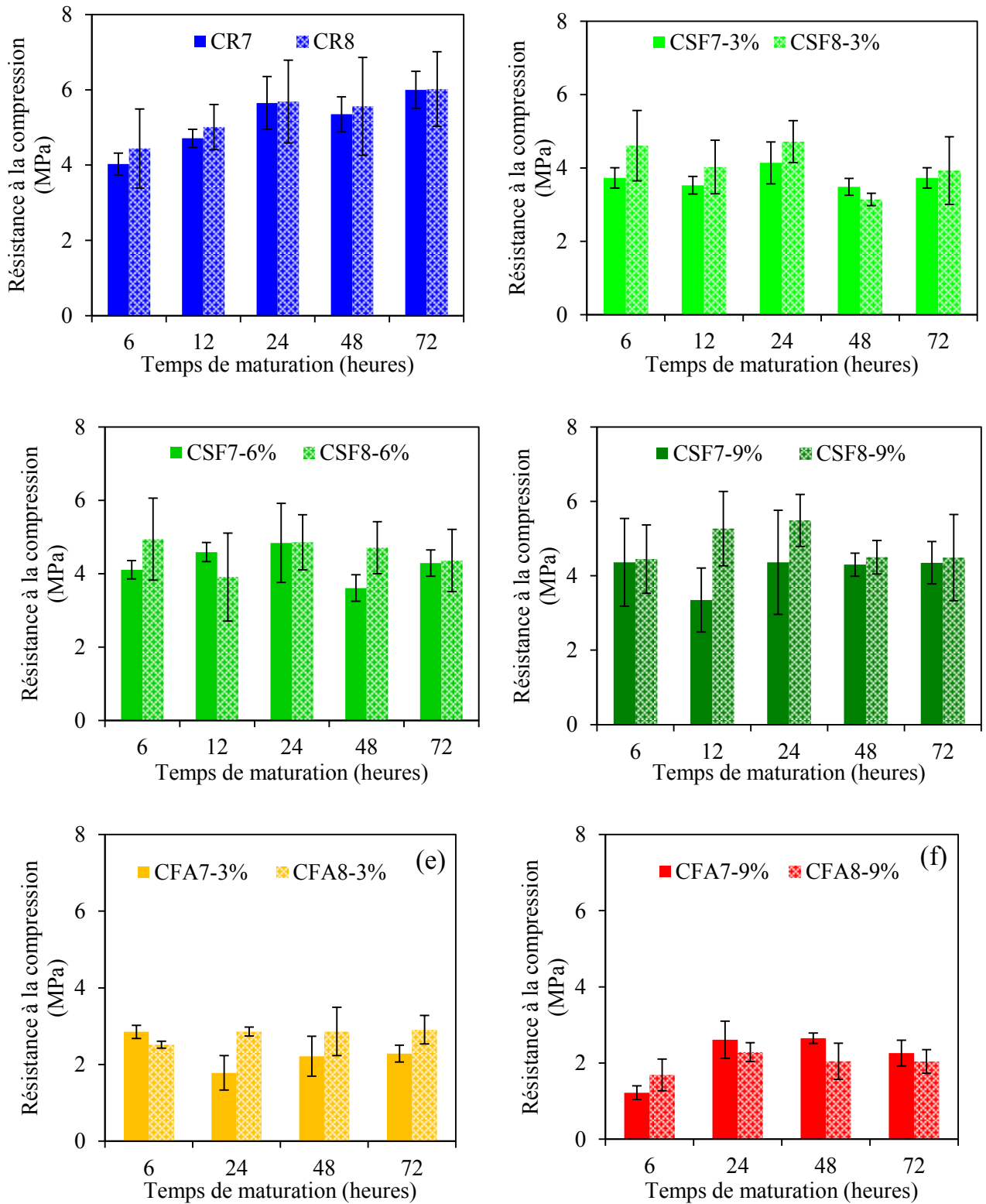


Figure III-37 : Effet du rapport L/S sur la résistance à la compression des ciments humides en présence et en absence d'antibiotique, en fonction du temps de maturation : (a) ciment de référence, (b-3%, c-6% et d-9%) ciments chargés avec du fusidate de sodium (e-3% et f-9%) et ciments chargés avec de l'acide fusidique.

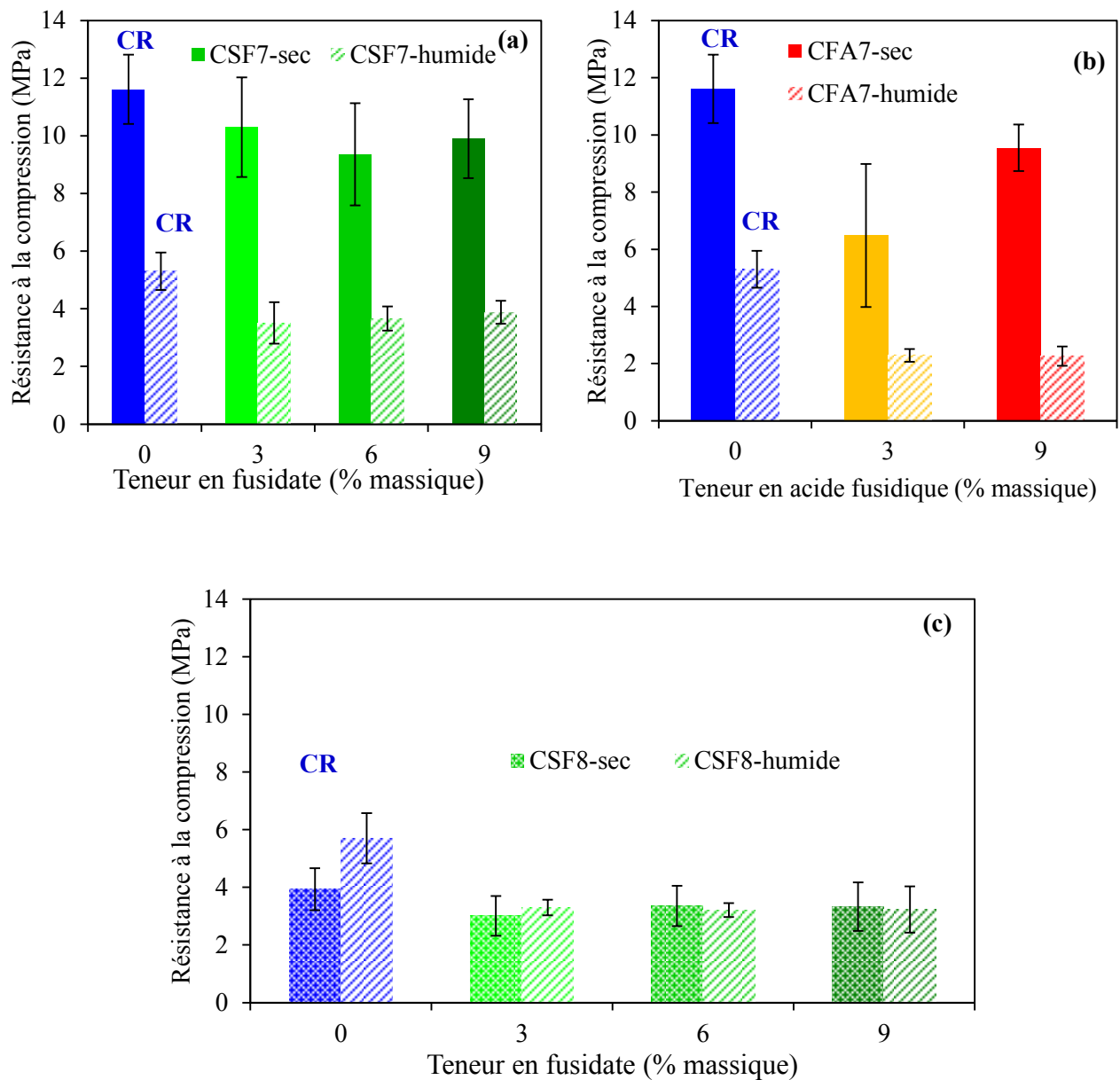


Figure III-38 : Effet des conditions de maturation des ciments sur leur résistance à la compression des ciments secs et humides : (a) et (c) correspondent au ciment de référence et ciments chargés avec différentes teneurs en fusidate de sodium et différents L/S, (b) ciment de référence et ciments chargés avec différentes teneurs en acide fusidique.

Conclusion

Nous avons démontré la faisabilité de ciments chargés en antibiotique sous forme hydrosoluble, le fusidate de sodium, ou peu soluble, l'acide fusidique. Nous avons ensuite examiné l'effet de l'incorporation du principe actif, sur les propriétés physicochimiques du produit final, et ce en terme de cinétique de réaction de prise et de temps de prise, d'injectabilité et de propriétés mécaniques. Pour cela, le rapport solide/liquide, la dose d'antibiotique et l'ajout d'un accélérateur de prise, ont été pris comme variables expérimentales.

L'étude par diffraction des RX et spectroscopie FTIR des ciments préparés montre que l'incorporation de l'antibiotique n'affecte pas la composition du produit final. En effet, le ciment obtenu en fin de réaction de prise consiste en un système apatite - vaterite analogue au minéral osseux, et ce indépendamment de la forme du principe actif.

L'analyse par spectroscopie FTIR des ciments élaborés a mis en évidence une cinétique de prise plus rapide pour les ciments chargés en fusidate de sodium, comparés au ciment de référence, et que cet effet est dose dépendant. Cependant, la cinétique de prise notée pour le ciment chargé en acide fusidique est analogue à celle du ciment de référence. L'étude a en outre montré que l'augmentation du rapport L/S accélère la réaction de prise quelle que soit la composition du ciment.

L'incorporation de l'antibiotique affecte également le temps de prise du ciment. Ainsi, l'introduction du fusidate de sodium s'accompagne d'une diminution du temps de prise, tandis que l'acide fusidique l'augmente. Par ailleurs, et pour tous les cas examinés, l'ajout d'un accélérateur de prise (Na_2HPO_4) réduit le temps de prise d'une manière significative, alors que l'augmentation du rapport L/S l'accroît considérablement.

La porosité totale et la résistance à la compression des ciments examinés sont étroitement liées au rapport L/S : l'augmentation de ce dernier paramètre augmente la porosité, ce qui se traduit par une réduction significative de la résistance à la compression des ciments durcis et secs. Par contre, la diminution de la porosité du ciment, suite à l'addition de l'antibiotique, n'affecte pas la résistance à la compression des ciments, et ce indépendamment de la valeur du rapport L/S.

L'injectabilité du ciment de référence est limitée suite à la séparation des phases solide et liquide. L'ajout de l'antibiotique (fusidate de sodium ou acide fusidique) ainsi que l'augmentation du rapport L/S favorisent l'extrusion de la pâte. L'analyse des courbes de l'évolution de la charge en fonction du déplacement du piston indique que le ciment CSF8-9% présente le meilleur profil d'injectabilité, comparé aux autres formulations de ciments examinées.

Nous nous sommes intéressés dans le cadre de cette étude à l'effet de l'association de l'antibiotique avec les ciments préparés sur les propriétés physicochimiques du produit final, et ce en termes de cinétique de réaction de prise et de temps de prise, d'injectabilité et de

propriétés mécaniques. Il serait intéressant d'examiner les facteurs qui gouvernent le processus de libération du principe actif à partir des différentes formulations des ciments et de tester l'activité antibactérienne des systèmes ciment-antibiotique préparés vis-à-vis de quelques souches bactériennes. Cette étude fera l'objet du chapitre IV.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ANTIBIOTIQUE ET EVALUATION DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES

PARTIE A
**ETUDE DE LA CINETIQUE DE
LIBERATION DE L'ANTIBIOTIQUE**

INTRODUCTION

L'infection osseuse, comme l'ostéomyélite ou la parodontite, est souvent associée à la perte osseuse et après une procédure de greffe osseuse ou la pose d'un implant synthétique, une antibiothérapie est généralement nécessaire pour prévenir ou traiter l'infection. Les céramiques bioactives chargées en antibiotique permettent la lutte contre l'infection tout en favorisant la régénération osseuse. Dans cette approche, il est essentiel non seulement pour assurer l'accès des médicaments au site osseux spécifique, mais aussi pour maintenir la concentration de médicament libérée dans la gamme thérapeutique pour de longues périodes de temps. Par conséquent, la cinétique de libération de l'antibiotique doit être soigneusement contrôlée.

La libération des principes actifs à partir des supports dépend de plusieurs facteurs : (i) facteurs architecturaux, notamment de la microstructure (taux de porosité, dimension des pores, tortuosité), (ii) facteurs chimiques qui tiennent compte de la solubilité du principe actif (PA) et (iii) éventuellement des facteurs physicochimiques qui conditionnent la résorbabilité ou la dégradation du matériau et influencent par ailleurs les interactions à l'interface entre le matériau et l'agent thérapeutique.

Les caractéristiques physicochimiques des ciments dépendent des conditions d'élaboration, de la nature du principe actif et de son mode d'association avec la matrice ; ces facteurs influent sur le processus de libération de ces matériaux. Dans ce cadre, nous avons mené une étude *in vitro* sur la cinétique de libération d'un antibiotique, la fusidine, à partir d'un ciment mixte CaCO_3 -CaP. Pour cela, deux formes de la fusidine ont été utilisées : l'acide fusidique (FA) et le fusidate de sodium (SF). Différentes concentrations (3, 6 et 9 % massique par rapport à la masse de la phase solide du ciment) ont été examinées pour le fusidate de sodium, tandis que pour l'acide fusidique l'étude s'est limitée à la dose 3 % à cause de la faible solubilité de cette forme de l'antibiotique dans le milieu de dissolution.

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre III), le rapport liquide/solide utilisé pour élaborer la pâte de ciment influe, non seulement sur ses caractéristiques rhéologiques (injectabilité) mais aussi sur sa porosité, paramètre déterminant les phénomènes qui se produisent lors de la libération du PA. En effet, la porosité favorise les phénomènes d'élution dans les ciments induisant ainsi une libération du PA plus rapidement et inversement lorsque le volume poreux diminue. Ainsi nous avons étudié deux ciments préparés avec des rapports L/S égal à 0,7 et à 0,8.

Les ciments phosphocalciques peuvent être rattachés à la catégorie des systèmes monolithiques non gonflables, et on peut supposer que la libération du médicament est principalement contrôlée par la diffusion à travers la matrice de ciment. Par conséquent, il faut s'attendre à ce que les caractéristiques physicochimiques de la matrice de ciment, en particulier la microstructure, jouent un rôle majeur dans la cinétique de sa libération. Dans ce contexte, nous nous proposons d'évaluer l'effet de la microstructure sur les mécanismes de libération de médicament. Pour cela, les tests de libération ont été réalisés avec (a) des ciments fraîchement

préparés (ou ciment frais), conditions qui se rapprochent d'une situation réelle d'implantation du ciment directement après sa préparation par le chirurgien, et (b) des ciments secs qui se rapprochent du cas où les chirurgiens utilisent des granulés.

I- LES DIFFERENTS MODELES DE LIBERATION DE MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE

L'association de molécules d'intérêt biologique avec des supports implantables en vue de leur libération contrôlée et locale à des fins thérapeutiques est sujet à de nombreuses études. La libération de biomolécules à partir de supports peut être régulée par différents mécanismes, seuls ou combinés (Figure VI-1) : (a) la désorption, (b) la diffusion, (c) la dégradation du support [Ji et al., 2012].

L'identification de ces mécanismes permet de pouvoir adapter les caractéristiques physico-chimiques et morphologiques de la forme à la cinétique de dissolution voulue. L'interprétation quantitative des valeurs obtenues lors de l'étude de dissolution est facilitée par l'utilisation d'équations génériques qui permettent une traduction mathématique du profil de libération en fonction de paramètres liés à la forme.

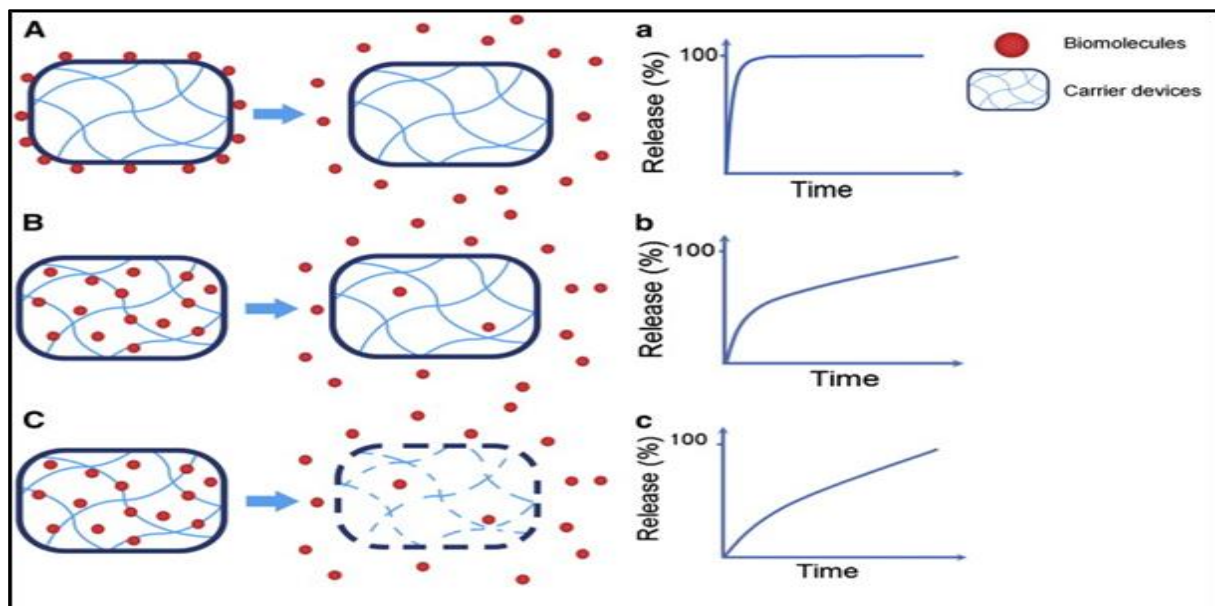


Figure IV-1: Représentation schématique des différents mécanismes de libération de biomolécules à partir de supports : (A) la désorption, (B) la diffusion, (C) la dégradation du support [Ji et al., 2012].

Afin d'utiliser le modèle de libération le plus adapté et de faire un choix parmi les nombreux modèles existants, il est nécessaire de tenir compte du comportement des matériaux au cours de la libération. Les ciments phosphocalciques utilisés peuvent être considérés, lorsqu'ils sont mis en contact avec un fluide aqueux à pH physiologique et en l'absence de cellules osseuses, comme des composés qui ne gonflent pas et ne se dégradent pas.

Pour étudier les mécanismes mis en jeu au cours de la libération des principes actifs associés à ces matériaux, nous avons choisi d'utiliser les modèles proposés par Higuchi [Higuchi, 1963], Korsmeyer & Peppas [Korsmeyer et al., 1983 ; Peppas, 1985] et Kopcha [Kopcha et al., 1991].

Korsmeyer et Peppas ont développé un modèle simple, semi-empirique, concernant la libération d'antibiotiques au cours du temps ; ce modèle est représenté par la relation :

$$Q = \frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1)$$

où « t » est le temps de libération (min), Q (ou M_t / M_∞) la fraction libérée du médicament, « k » une constante cinétique, et « n » le coefficient de diffusion. Le paramètre « n » donne une indication sur le mécanisme de libération du médicament, et prend différentes valeurs en fonction de la géométrie du dispositif de libération. Pour la forme cylindrique la valeur de « n » est égale à 0,5 pour la diffusion de Fick, et est comprise entre 0,5 et 1,0 pour une libération où il y a coexistence de diffusion et d'érosion [Canal et al., 2013].

Higuchi a développé plusieurs modèles théoriques pour étudier la libération des médicaments. Le modèle d'Higuchi simplifié est exprimé par l'équation :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Q = at^{0.5} \quad (2)$$

où « t » est le temps de libération, M_t la quantité de médicament libérée à l'instant t, M_∞ la quantité totale de médicament dans le ciment, et « a » la constante de diffusion d'Higuchi. Ce modèle montre une bonne corrélation pour les profils de libération dont le mécanisme prédominant est la diffusion Fickienne simple.

Le modèle Kopcha peut être facilement utilisé pour mettre en évidence l'existence du phénomène de diffusion et d'érosion. Ce modèle est représenté par l'expression suivante :

$$M_t = A\sqrt{t} + Bt \quad (3)$$

où M_t est la quantité de médicament libérée au moment t, « A » le terme de diffusion, et « B » le terme d'érosion. Lorsque le rapport A / B est supérieur à 1, le phénomène de diffusion est prédominant.

Pour déterminer les constantes (n, a, A et B), les données expérimentales ont été traitées selon les 3 modèles présentés ci-dessus (équations (1), (2) et (3)).

La comparaison de certains profils de libération peut être évaluée par les facteurs de similarité et de différence (respectivement f_1 et f_2) ; ces facteurs font partie des méthodes modèles indépendantes adoptées par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMEA (European Medicines Agency) comme critères de similarité *in vitro* entre deux profils de dissolution [Shah, 1998].

Pour que deux profils puissent être considérés comme similaires les valeurs de ces indices doivent être respectivement pour le facteur de similarité f_2 , compris entre 50 et 100 et pour le facteur de différence f_1 , compris entre 0 et 15 [O'Hara et al., 1998 ; Costa et Jose, 2001].

La comparaison de profils de libération est également évaluée par le temps nécessaire pour libérer x% de principe actif ($t_{x\%}$).

II-PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les tests de libération de l'antibiotique à partir des ciments ont été réalisés en accord avec la pharmacopée européenne (7ème édition). Pour cela, les essais ont été menés à l'aide d'un appareil Dissolutest (Pharmatest®) muni d'un système d'agitation à palettes tournantes adapté sur des bols en parallèle et à température contrôlée (Figure IV-2). Des blocs de ciments sous forme cylindrique (17,5 mm de diamètre et 10 mm de hauteur) ont été élaborés selon le protocole décrit précédemment (Chapitre II).

Afin d'examiner l'effet de la microstructure sur la libération du principe actif, des ciments ont été utilisés à l'état frais ou sec. Les ciments frais sont introduits 1h30 après leur préparation (durée légèrement inférieure au temps de prise final des ciments) dans le milieu de libération, alors que les ciments secs ont été préparés, puis laissés à maturer pendant 48 h à 37° C dans un milieu humide et enfin séchés pendant une semaine dans une étuve à 37°C.

Les ciments examinés ont été préparés avec des rapports L/S égal à 0,7 et à 0,8. Ils ont été associés à l'acide fusidique (CFA) ou au fusidate de sodium (CSF). La teneur en antibiotique dans les ciments est de 3, 6 et 9 % m/m dans le cas de fusidate de sodium, et 3 % dans le cas de l'acide fusidique.

Après pesée, chaque bloc de ciment a été immergé dans un récipient contenant 1 L de solution de NaCl 0.9 % (m/m) dont le pH a été ajusté au pH physiologique (pH = 7,4). Les récipients sont fermés par un couvercle et la solution a ensuite été agitée durant 34 jours à la vitesse de 100 trs/min, ce qui permet d'homogénéiser sa composition dans tous les bols et tout au long de l'essai. Des prélèvements de 10 mL de solution ont été réalisés régulièrement, et la quantité prélevée a été immédiatement remplacée par la même quantité de solution fraîche de NaCl 0,9 % (m/m), afin de maintenir le volume du bain constant tout au long de l'expérience. La modification de concentration dans chaque bol liée à ces ajouts successifs a été prise en compte dans tous les calculs. La solution prélevée a été filtrée sur des filtres millipores de 0,2 μm afin d'éviter la présence de très fines particules de ciments qui pourraient biaiser l'analyse de l'antibiotique et du calcium dans la solution. Les quantités d'antibiotique et de calcium libérées ont été dosées respectivement par spectrophotométrie UV à 235 nm pour l'antibiotique et par absorption atomique pour le calcium.

Il est à noter que durant tout le test, une seule face du bloc de ciment est en contact avec la solution (Figure IV-2) afin que la libération ne se produise que sur une face (pas de libération dans toutes les directions). Dans ces conditions, l'utilisation de modèles mathématiques pour décrire les mécanismes impliqués durant la libération est ainsi plus aisée.

Les analyses microstructurales sur les ciments avant et après libération a été réalisée à l'aide d'un porosimètre à mercure. Il est à noter que, les ciments après test de libération ont été séchés pendant 48 h à température ambiante, puis 5 jours à 37°C dans l'étuve.

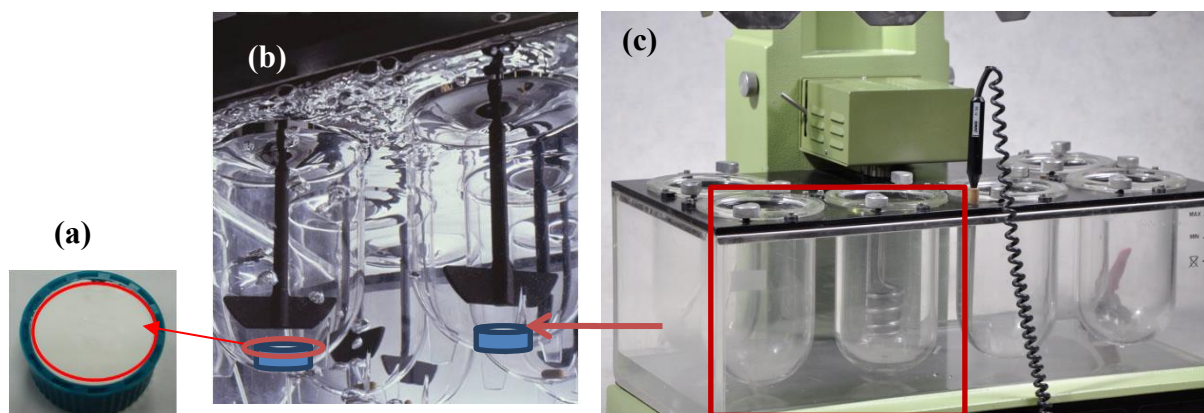


Figure IV-2 : Dispositif utilisé pour suivre la cinétique de libération de l'antibiotique : a) vue de la surface du bloc de ciment qui sera en contact avec la solution ; b) et c) photographies du dispositif Dissolutest (Pharmatest®).

III- RESULTATS ET DISCUSSION

Nous présenterons dans un premier temps les résultats de libération du principe actif obtenus avec les ciments secs, tout en prenant comme variables expérimentales le rapport L/S, la voie d'introduction de l'antibiotique et sa dose. Nous donnerons ensuite les résultats obtenus avec les ciments frais.

III-1- Etude à partir de ciments secs

III-1-1- Influence du rapport L/S

L'influence de la microstructure du ciment sur sa capacité à libérer le principe actif a été évaluée sur deux ciments (CSF7 et CSF8) qui contiennent la même quantité d'antibiotique (9 % de SF). Les modifications de la microstructure du ciment sont obtenues en faisant varier le rapport Liquide/Solide ($L/S = 0,7$ et $0,8$). L'évolution des taux de fusidate libérés par les ciments CSF7 et CSF8 en fonction du temps est présentée sur la figure IV-3. Les résultats obtenus montrent que, quel que soit le rapport L/S utilisé, l'élution du principe actif s'effectue de manière progressive assurant ainsi une libération prolongée. La vitesse de libération évaluée par l'intermédiaire de $t_{20\%}$ (temps nécessaire pour libérer 20 % du principe actif) diminue lorsque le rapport L/S diminue. En effet, le ciment qui possède un rapport $L/S = 0,7$ (CSF7-9%) met 27 jours à libérer 20 % du principe actif, contre 12 jours seulement pour celui préparé avec un rapport $L/S = 0,8$ (CSF8-9%). Après 34 jours, les taux d'élution du fusidate de sodium sont d'environ 30 % et 22 %, respectivement pour les ciments CSF8-9% et CSF7-9%. L'utilisation

des facteurs statistiques f_1 et f_2 (Tableau IV-1) confirme le fait que ces deux cinétiques sont statistiquement différentes ($f_1 > 15$ et $f_2 > 50$).

L'analyse des cinétiques d'élution du fusidate de sodium par les ciments étudiés (Figure IV-4) indique que les quantités éluées ($\text{mg.L}^{-1}/\text{jour}$) durant le premier jour (J_1) sont massives (entre 10 et 9 mg/L pour les deux ciments). La concentration libérée le second jour (J_2) est moins importante : 3,5 et 1,8 mg/L respectivement pour les ciments CSF8-9% et CSF7-9%. Pour le reste de la période de l'essai, la dose de principe actif libérée reste relativement constante et se stabilise après le 5^{ème} jour dans la gamme entre 2 et 1 $\text{mg.L}^{-1}/\text{jour}$.

La comparaison des profils de libération obtenus selon les modèles établis par Higuchi, Korsmeyer et Peppas et Kopcha (Tableau IV-2), permet d'affirmer que quel que soit le rapport L/S utilisé, les mécanismes impliqués dans la libération du PA sont principalement dus à un processus de diffusion. Les valeurs de l'exposant « n » données par le modèle de Korsmeyer et Peppas ($n < 0,5$) indiquent que la libération suit la loi de Fick. Les valeurs des rapports A/B ($\gg 1$) obtenues en appliquant le modèle de Kopcha permettent de démontrer que, si phénomènes d'érosion il y a, ils sont nettement infimes par rapport aux phénomènes de diffusion. Les valeurs de « a » obtenues par l'application du modèle de Higuchi montrent que le ciment CSF8-9% libère plus rapidement l'antibiotique que le ciment CSF7-9%.

Il est important de rappeler que les analyses sont effectuées *in vitro*, à pH physiologique et en l'absence de cellules macrophages. L'érosion du ciment ne peut donc se produire que par dissolution de celui-ci dans le milieu de libération et peut être considérée comme extrêmement faible et négligeable. En revanche, lorsque le ciment sera implanté, l'activité biologique des cellules osseuses favorisera sa résorption facilitant ainsi la libération du principe actif selon un processus d'érosion. Ce paramètre sera donc à prendre en considération.

Les résultats de dissolution corrélés avec les analyses microstructurales mettent en évidence l'existence de deux phénomènes concomitants qui influencent la libération du PA et permettent d'expliquer les résultats obtenus. D'une part, les pores de petites tailles sont plus difficilement accessibles par le milieu de dissolution réduisant ainsi les phénomènes de diffusion, d'autre part, la diminution de la porosité totale et donc du volume poreux diminuent les phénomènes d'élution (Chapitre III partie B, paragraphe II-6-1-2). C'est la raison pour laquelle, le ciment préparé avec un rapport L/S = 0,7, qui présente des tailles de pores plus petites et un volume poreux moins important que le ciment préparé avec un rapport L/S = 0,8, libère le principe actif plus lentement.

Dans la suite de l'étude, nous avons souhaité examiner l'influence de la dose, de la voie d'introduction de l'antibiotique et l'effet de l'état du ciment (sec ou humide) sur la microstructure du ciment et par conséquent sur les cinétiques de libération. Nous avons choisi de travailler avec le ciment préparé avec un rapport L/S = 0,8 afin de pouvoir suivre « plus rapidement » la libération du PA.

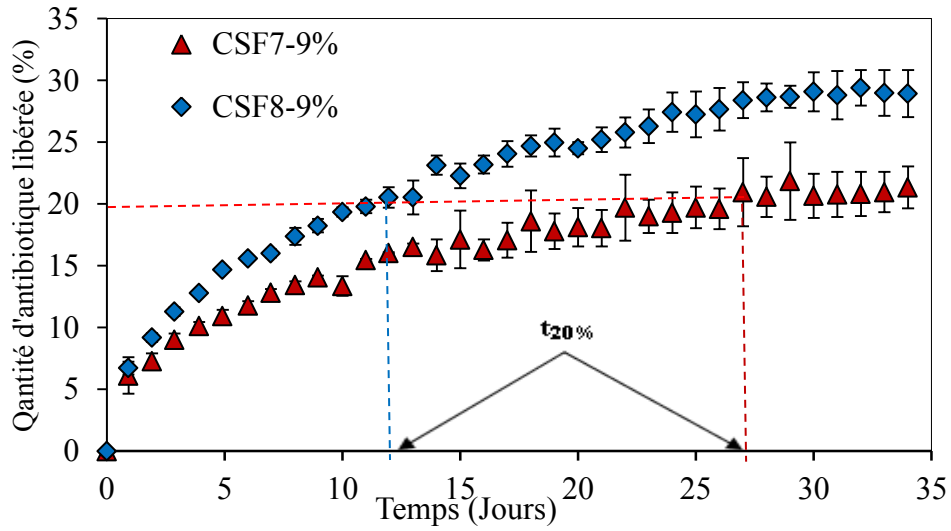


Figure IV-3: Cinétique de libération des ciments chargés à 9 % en fusidate de sodium en fonction du rapport L/S (CSF7-9% et CSF8-9%).

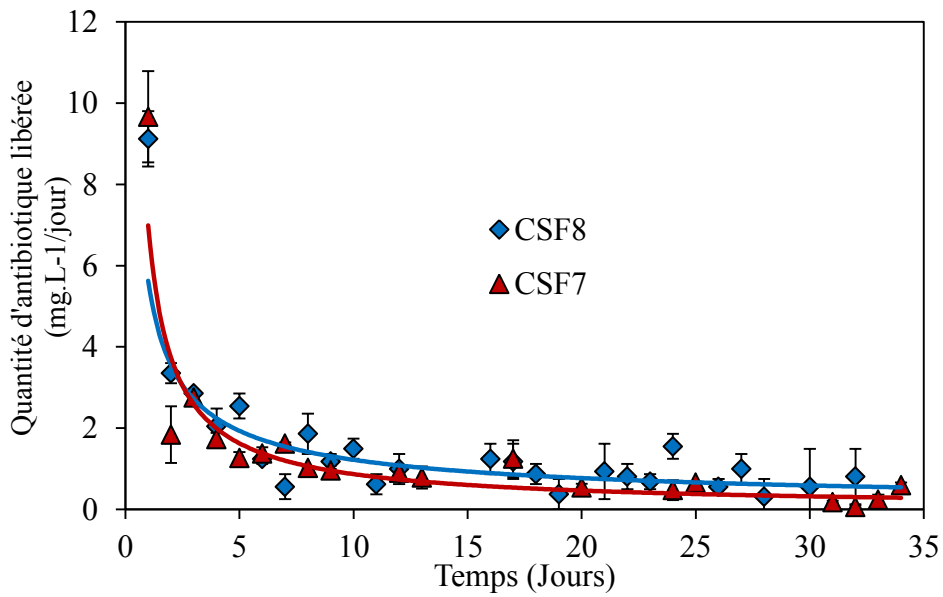


Figure IV-4: Quantité de fusidate de sodium libérée (mg.L⁻¹/jour) en fonction du temps par les ciments chargés à 9 % en antibiotique (CSF7-9% et CSF8-9%).

III-1-2- Influence de la voie d'introduction de l'antibiotique

Cette étude a été effectuée en introduisant l'antibiotique à une même dose (3%) dans le ciment préparé avec un L/S = 0,8.

La figure IV-5 présente l'évolution de la cinétique de libération de l'antibiotique à partir du ciment chargé avec l'acide fusidique (CFA8-3%) ou avec le fusidate de sodium (CSF8-3%). Les valeurs des $t_{20\%}$ déterminées pour les deux ciments (15 jours pour CFA et 7 jours pour CSF) montrent que la vitesse de libération de l'acide fusidique, introduit initialement dans la phase solide est plus lente que celle du fusidate de sodium, introduit dans la phase liquide. Cette disparité est d'ailleurs confirmée par les valeurs des coefficients de différence et de similitude déterminés lors de la modélisation des profils de dissolution (Tableau IV-3) ; ils indiquent que les quantités d'antibiotique éluées par jour ($\text{mg.L}^{-1}/\text{jour}$) pour le ciment chargé en fusidate de sodium sont plus importantes comparées au ciment chargé en acide fusidique (Figure IV-6). Le mode d'association de l'antibiotique avec le ciment pourrait être à l'origine de la différence de comportement observée entre les ciments étudiés. Il a été rapporté [Kisanuki, 2007] que l'incorporation du principe actif dans la phase solide conduisait à un mélange moins homogène qui rendait l'accessibilité du PA ainsi que sa capacité à diffuser plus difficiles. Le manque d'accessibilité de l'antibiotique n'est probablement pas la seule raison. Il est en effet possible que sa faible solubilité vient s'ajouter aux problématiques de diffusion, ralentissant ainsi sa libération à l'extérieur de la matrice. Néanmoins, les comparaisons faites avec les modèles de libération existants montrent que quel que soit le mode d'incorporation du PA, les mécanismes prépondérants mis en jeu lors de la libération du PA sont des mécanismes de diffusion (Tableau IV-4).

Les analyses microstructurales réalisées à l'aide du porosimètre à mercure (Tableau IV-5 et Figure IV-7) révèlent une porosité plus importante pour les ciments CFA comparés aux ciments CSF. Ceci vient conforter l'hypothèse que ce n'est pas uniquement la microstructure qui influence la libération du PA mais aussi sa solubilité et probablement son positionnement à l'intérieur même de la matrice du ciment.

Tableau IV-1 : Facteurs de différence f_1 et de similitude f_2 des ciments CSF7-9% et CSF8-9%

	CSF7-9% –CSF8-9%	Spécifications
f_1	35,4	0 – 15
f_2	60,1	50 – 100

Tableau IV-2 : Comparaison des profils de dissolution selon les modèles de Higuchi, Korsmeyer et Peppas et Kopcha.

Modèle	Equation	Paramètres	CSF7-9%	CSF8-9%
Higuchi	$Q(\%) = at^{1/2} + b$	r^2 a	0,970 0,600	0,986 0,992
Korsmeyer et Peppas	$Q(\%) = kt^n$	r^2 n	0,988 0,36	0,993 0,400
Kopcha	$Q = A\sqrt{t} + Bt$	r^2 A/B	0,970 >> 1	0,992 >> 1

Tableau IV-3 : Facteurs de différence f_1 et de similitude f_2 des ciments CFA8-3% et CSF8-3%

	CFA8-3% - CSF8-3%	Spécifications
f_1	45,3	0 – 15
f_2	52,6	50 – 100

Tableau IV-4 : Comparaison des cinétiques de libération pour les ciments chargés avec 3 % en acide fusidique (CSF8-3%) ou en fusidate de sodium (CSF8-3%) selon les modèles proposés par Higuchi, Korsmeyer et Peppas et Kopcha.

Modèle	Paramètres	CFA8-3%	CSF8-3%
Higuchi	r^2 a	0,987 0,732	0,979 0,998
Korsmeyer et Peppas	r^2 n	0,992 0,45	0,986 0,42
Kopcha	r^2 A/B	0,992 >>1	0,984 >>1

Tableau IV-5 : Porosité des ciments avant libération en fonction de l'antibiotique introduit dans le ciment

	CFA8- 3%	CSF8-3%
Porosité totale (%) [5 nm - 300 µm]	80	78
Microporosité (%) [5 nm - 2 µm]	74	67

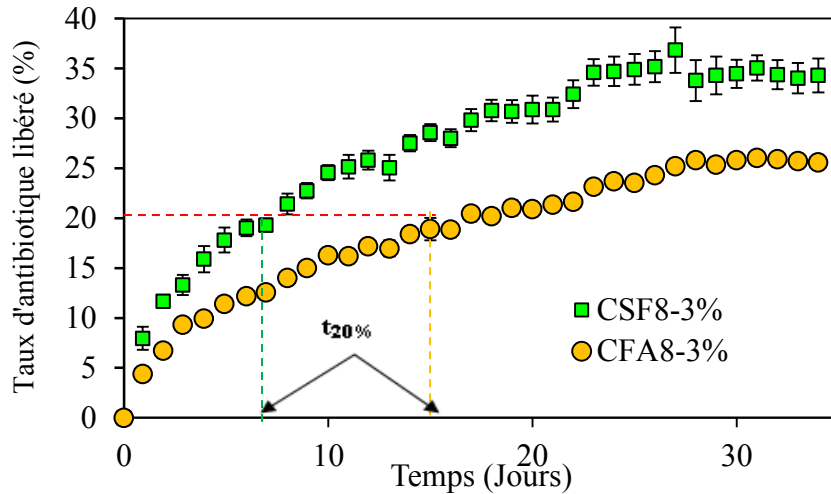


Figure IV-5 : Cinétiques de libération de l'antibiotique à partir des ciments préparés avec $L/S = 0,8$ et chargés avec 3 % en fusidate de sodium (CSF8-3%) ou en acide fusidique (CFA8-3%).

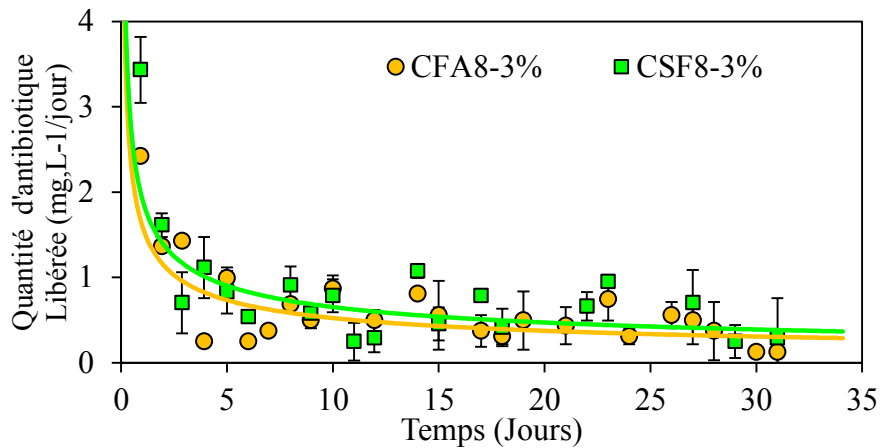


Figure IV-6: Quantités ($\text{mg.L}^{-1}/\text{jour}$) d'antibiotique libéré à partir des ciments préparés avec $L/S = 0,8$ et chargés avec 3 % de fusidate de sodium (CSF8-3%) ou d'acide fusidique (CFA8-3%).

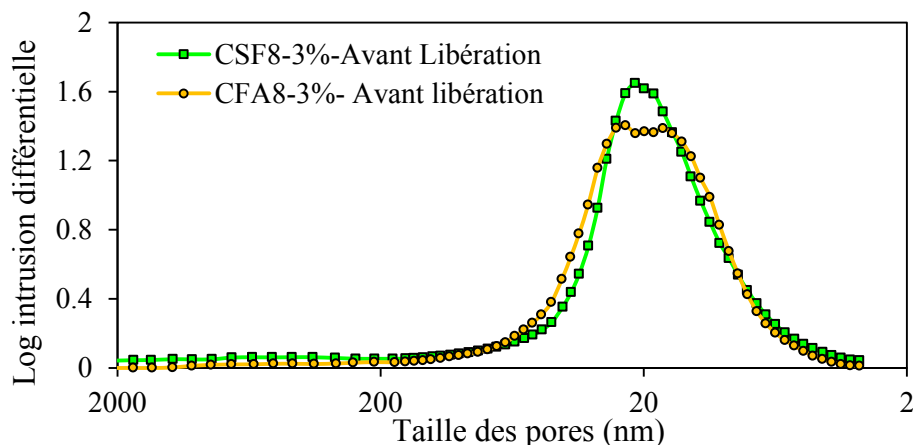


Figure IV-7: Distribution de la taille des micropores des ciments préparés avec $L/S = 0,8$ et contenant le fusidate de sodium (CSF8-3%) ou l'acide fusidique (CFA8-3%).

III-1-3- Influence de la dose d'antibiotique

Dans cette partie nous souhaitons examiner l'influence de la dose d'antibiotique introduite sur la porosité du ciment et par conséquent sur sa cinétique de libération. L'étude a été menée uniquement sur les ciments chargés en fusidate de sodium, avec des doses de 3%, 6% et 9%.

L'évolution des taux d'antibiotique élués en fonction du temps par les ciments étudiés (Figure IV-8) est caractéristique de cinétiques relativement lentes. Les ciments chargés avec 6 % ou 9 % de fusidate de sodium montrent des profils de libération similaires et différent du ciment CSF8-3% en termes de quantités libérées par jour. En fait, le pourcentage cumulé de principe actif libéré par le ciment CSF8-3 % atteint 35 % après 34 jours, tandis que ce taux est de l'ordre de 30 % pour les ciments CSF8-6% et CSF8-9%. L'évaluation des profils de libération par l'intermédiaire de $t_{20\%}$ indique que la vitesse de libération la plus importante est notée pour le ciment CSF8-3%, comparé aux ciments contenant 6 et 9% d'antibiotique. Les valeurs de f_1 et f_2 (Tableau IV-6) confirment la parfaite mais néanmoins troublante similitude entre les cinétiques obtenues pour les ciments CSF8-6% et CSF8-9%.

Si l'on examine les quantités (concentrations) d'antibiotique libérées par jour (Figure IV-9), on note que lors du premier jour (J_1) l'élution est massive pour le ciment CSF8-9% (9,1 mg/L), suivi du ciment CSF8-6% (6,2 mg/L) et puis du ciment CSF8-3% (3,4 mg/L). Les quantités éluées le jour J_2 sont relativement faibles et sont respectivement de 3,5, 2 et 1,5 mg/L. Pour le reste de la période d'essai, les teneurs éluées restent comprises entre 2 et 0,5 mg/L pour les ciments examinés.

Les comparaisons faites sur la base des modèles mathématiques (Tableau IV-7) permettent d'affirmer que la libération du PA s'effectue principalement par un phénomène de diffusion. La valeur de l'exposant « n » obtenue selon le modèle de Korsmeyer-Peppas ($n < 0,5$) indique une diffusion qui obéit à la loi de Fick. La valeur du rapport $A/B > 1$ déduite du modèle de Kopcha permet d'affirmer que la libération s'effectue majoritairement par diffusion du principe actif à travers le volume poreux du ciment, et que si le phénomène d'érosion existe, il reste bien négligeable.

Les analyses de porosité effectuées sur les ciments avant libération du principe actif révèlent une diminution de la porosité suite à l'augmentation de la dose introduite (Tableau IV-8). Après libération, la porosité croît avec la dose de fusidate introduite dans le ciment (Tableau IV-8). L'augmentation de la porosité du ciment après libération est liée à la dissolution et à la libération de l'antibiotique qui crée alors une porosité secondaire supplémentaire qui vient s'ajouter au volume poreux déjà existant au sein du ciment.

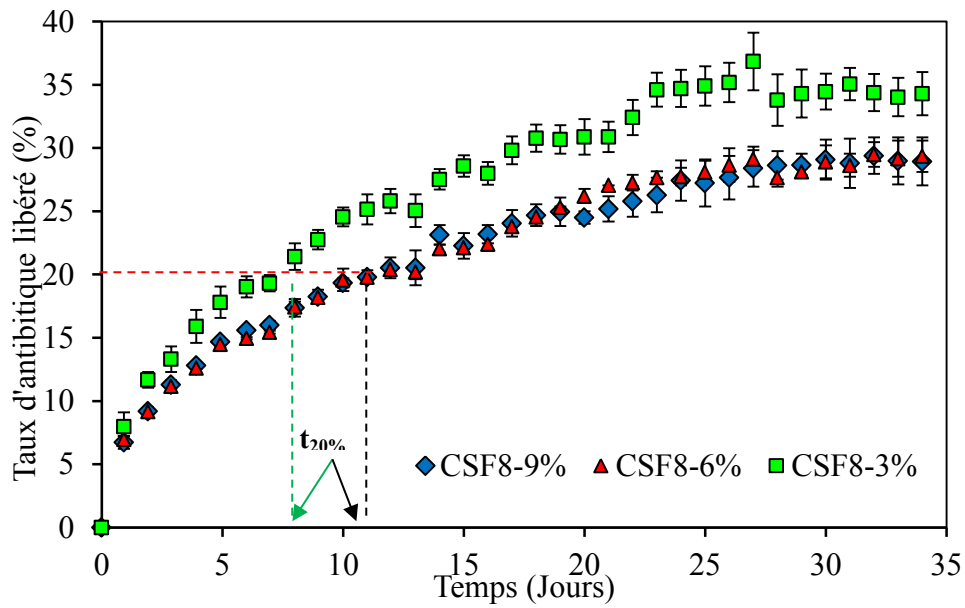


Figure IV-8 : Cinétiques de libération des ciments préparés avec L/S = 0,8 et chargés en fusidate de sodium (CSF) introduit à différentes doses (3, 6 et 9 %).

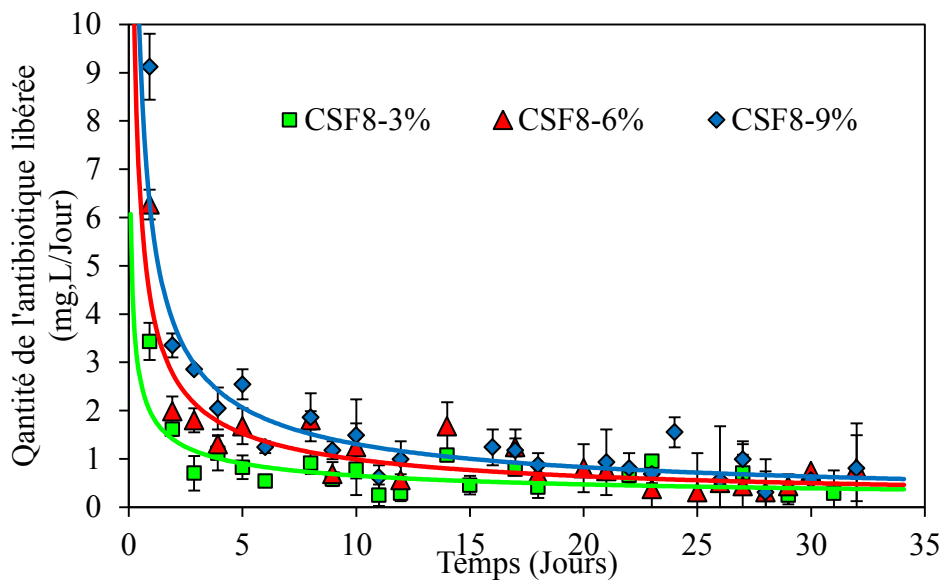


Figure IV-9 : Quantités ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}/\text{jour}$) de fusidate de sodium libérées à partir des ciments préparés avec L/S = 0,8 et incluant différentes doses d'antibiotique (CSF8-3%, CSF8-6% et CSF8-9%).

Tableau IV-6 : Facteurs de différence et de similitude des cinétiques obtenues pour différentes doses de fusidate de sodium introduites dans le ciment préparé avec L/S = 0,8.

	CSF8 3% - 6%	CSF8 3% - 9%	CSF8 6% - 9%	Spécifications du test
f₁	18,4	23,4	2,2	0 - 15
f₂	63,5	62,7	95,7	50 - 100

Tableau IV-7 : Comparaison des profils de libération selon les modèles de Higuchi, Korsmeyer & Peppas et Kopcha pour des ciments chargés avec différentes doses en fusidate de sodium.

Modèles	Paramètres	CSF8-3%	CSF8-6%	CSF8-9%
Higuchi	r^2	0,979	0,986	0,994
	a	0,998	0,783	0,782
Korsmeyer et Peppas	r^2	0,986	0,988	0,994
	n	0,42	0,42	0,41
Kopcha	r^2	0,984	0,988	0,993
	A/B	>>1	>>1	>>1

Tableau IV-8: Porosité des ciments avant et après test de libération en fonction de la dose de fusidate de sodium introduite.

	CSF8-3%		CSF8-6%		CSF8-9%	
	Avant libération	Après libération	Avant libération	Après libération	Avant libération	Après libération
Porosité totale (%) [5 nm - 300 µm]	78	89	76	93	70	88
Microporosité (%) [5 nm - 2 µm]	67	76	69	84	64	82

Les résultats obtenus indiquent que la voie d'introduction de l'antibiotique influe sur la microstructure de la matrice et sur la cinétique de libération. Les modifications induites sur la microstructure ne sont pas à elles seules responsables des différences notées sur les cinétiques de libération. La solubilité du principe actif joue aussi un rôle non négligeable.

Afin de s'affranchir des différences de solubilité, nous avons suivi les modifications induites par le même principe actif introduit dans la phase liquide mais à des doses variables. Les résultats obtenus lors du suivi de la libération de l'antibiotique, corrélés avec les caractéristiques microstructurales des ciments, sont en désaccord avec le fait que seule la microstructure influence la diffusion du principe actif. En effet, malgré une diminution du volume poreux de l'ordre de 6 % dans le cas des ciments chargés avec 6 % et 9 % de fusidate de sodium, les cinétiques de dissolution ne paraissent pas significativement différentes.

III-2- Etude à partir de ciments frais

Lors d'une intervention chirurgicale, les ciments seront implantés sous forme pâteuse, c'est-à-dire directement après leur préparation, d'où l'intérêt d'étudier également la libération de l'antibiotique à partir de ciments fraîchement préparés. Dans cette partie, nous examinerons l'effet du rapport L/S et de la nature de l'antibiotique sur sa libération à partir des ciments frais. Nous étudierons également l'effet de l'état du ciment sur sa capacité à libérer l'antibiotique (comparaison de la libération de l'antibiotique à partir des ciments secs et des ciments frais).

III-2-1- Influence de l'état humide du ciment

L'influence de l'état humide des ciments sur la libération du PA a été examinée. L'étude de libération du fusidate de sodium a porté sur le ciment frais placé 1h30 après sa préparation dans le milieu de libération (NaCl 0,9 % à pH physiologique). Les figures IV-11 et IV-12 présentent respectivement l'évolution des cinétiques de libération du ciment frais chargé en fusidate de sodium à 3% (CSF8-3%-Frais) et celui chargé à 9 % (CSF8-9%-Frais). Les cinétiques de libération de l'antibiotique à partir des ciments secs préparés avec le même rapport L/S et la même dose en antibiotique sont également reportées sur ces figures pour comparaison. Les résultats obtenus dans les conditions examinées mettent en évidence des profils de libération similaires pour les ciments frais et secs. Les valeurs des facteurs f_1 et f_2 (Tableaux IV-9) confirment la similitude entre les cinétiques obtenues pour ces deux types de ciments ($f_1 < 15$ et $f_2 > 50$).

L'évaluation des vitesses de libération de l'antibiotique par l'intermédiaire de $t_{20\%}$ montre que les ciments secs possèdent une vitesse de libération légèrement plus rapide comparée à celle des ciments frais. En fait, le taux correspondant à 20% de libération est atteint après 12 jours pour le ciment CSF8-9%-Sec, tandis que ce taux est atteint au bout de 15 jours pour le ciment CSF8-9%-Frais ; la même tendance est notée pour les ciments chargés à 3 % en principe actif (7 jours pour CSF8-3%-Sec et 10 jours pour CSF8-3%-Frais) ; ces résultats montrent que

la vitesse de libération du fusidate à partir des ciments frais est plus lente que celle observée pour les ciments secs.

La comparaison des profils de dissolution sur la base des modèles définis auparavant (Tableau IV-10) attestent que la libération du PA à partir des ciments frais est régie par les phénomènes de diffusion et d'érosion. Les valeurs de l'exposant « n » déterminées à partir du modèle de Korsmeyer-Peppas ($n > 0,5$) traduit que la libération ne suit pas la loi de Fick. Les valeurs des rapports A/B (> 1) obtenues selon le modèle de Kopcha indiquent que le phénomène de diffusion est plus important, comparé au processus d'érosion.

Les analyses microstructurales corrélées avec les résultats de libération permettent d'expliquer la différence de vitesse de libération entre les deux ciments. Les résultats de la porosité totale ainsi que la distribution de pores des ciments secs et frais après libération sont respectivement répertoriés dans le tableau IV-11 et présentés sur les figures IV-13 et IV-14. On note, d'une part, que la porosité des ciments secs est plus importante comparée à celle des ciments frais, et que la taille des pores dans les ciments secs est plus importante que celle dans des ciments frais. D'une part, les pores de petites tailles sont difficilement accessibles par le milieu de dissolution réduisant ainsi les phénomènes de diffusion ; d'autre part, la diminution de la porosité totale et donc du volume poreux du ciment réduisent les phénomènes d'élution. C'est la raison pour laquelle, les ciments frais, qui présentent des tailles de pores plus petites et un volume poreux moins important que les ciments secs, libèrent le principe actif plus lentement.

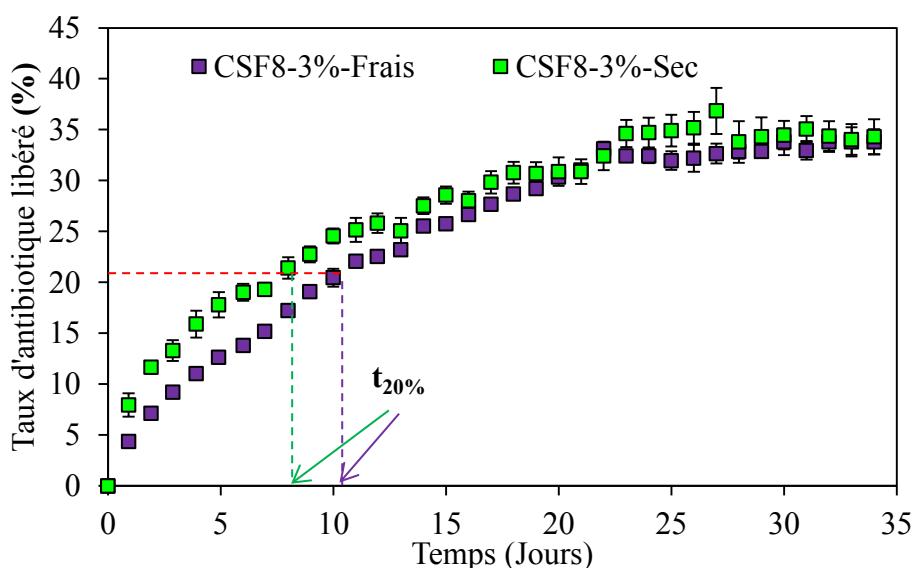


Figure IV-11 : Comparaison de profils de libération à partir de ciments frais et secs chargés avec 3 % de fusidate de sodium.

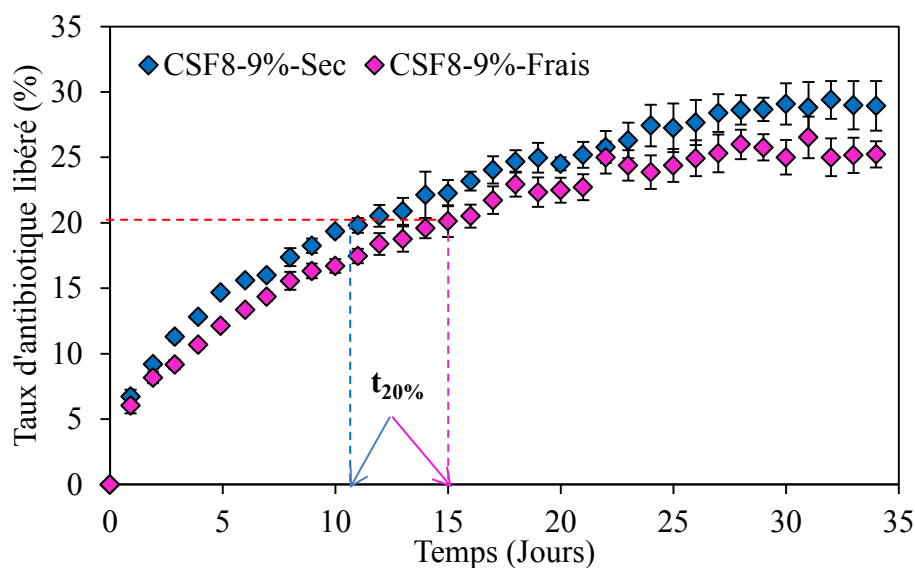


Figure IV-12 : Comparaison de profils de libération des ciments frais et secs chargés avec 9% de fusidate de sodium.

Tableau IV-9: Paramètres de différence et de similitude des cinétiques obtenues pour des ciments frais ou secs chargés avec 3% et 9% de fusidate de sodium.

	CSF8-3% Sec - Frais	CSF8-9% Sec - Frais	Spécifications du test
f1	10,6	11,8	0 - 15
f2	74,8	78,8	50 - 100

Tableau IV-10 : Comparaison des profils de libération des ciments secs ou frais chargés avec 3 % (CSF8-3%) et 9 % (CSF8-9%) de fusidate de sodium.

Modèle	Paramètres	CSF8-3%		CSF8-9%	
		Sec	Frais	Sec	Frais
Higuchi	r^2	0,943	0,973	0,985	0,980
	a	1,084	1,404	0,901	0,894
Korsmeyer et Peppas	r^2	0,962	0,975	0,992	0,987
	n	0,371	0,530	0,383	0,419
Kopcha	r^2	0,950	0,977	0,985	0,983
	A/B	>1	>1	>1	>1

Tableau IV-11 : Porosité après test de libération des ciments frais ou secs chargés avec 3 % et 9 % de fusidate de sodium.

	CSF8-3%- Sec	CSF8-3%- Frais	CSF8-9%- Sec	CSF8-9%- Frais
Porosité totale (%) [5 nm - 300 µm]	89	78	88	76,
Microporosité (%) [5 nm - 2 µm]	76	75	82	72

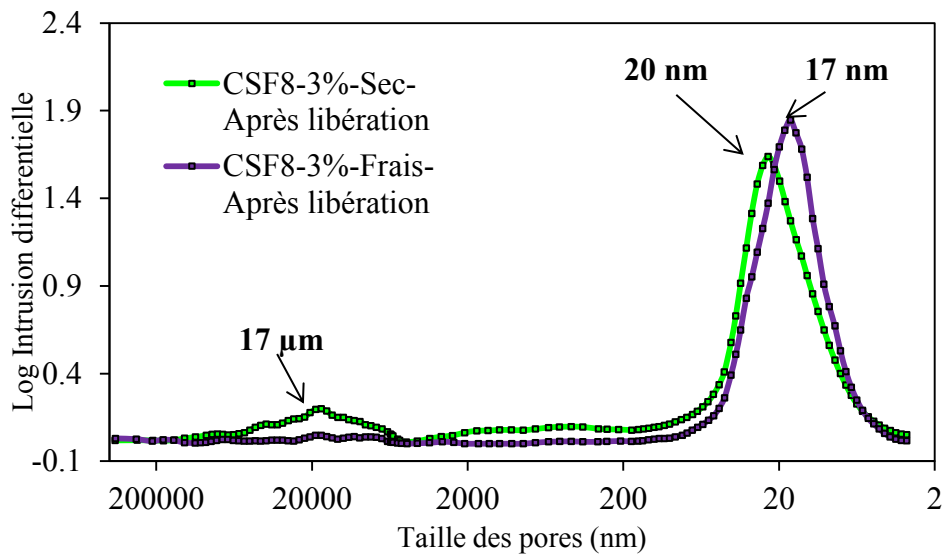


Figure IV-13 : Courbes de distribution de la taille des pores après test de libération pour des ciments secs ou frais chargés avec 3 % de fusidate de sodium.

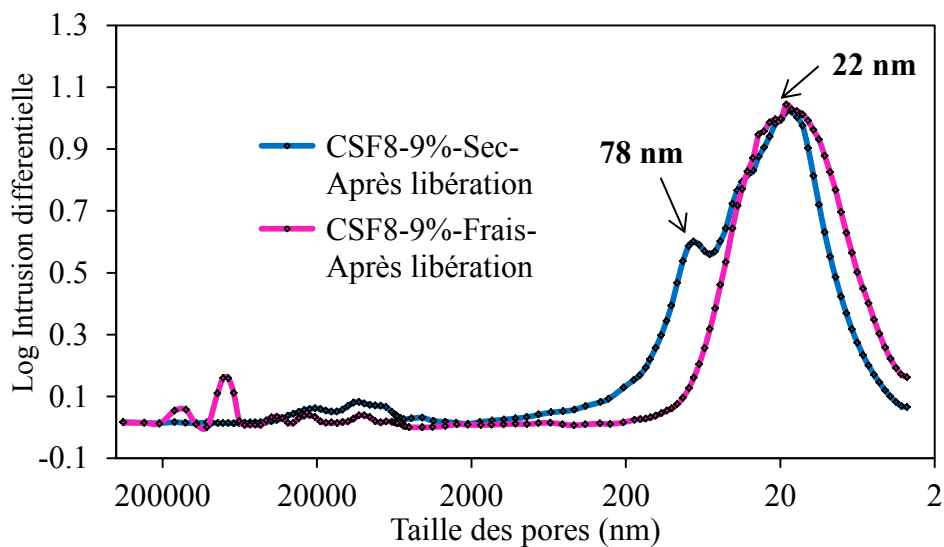


Figure IV-14 : Courbes de distribution de la taille des pores après test de libération des ciments secs ou frais chargés avec 9% de fusidate de sodium .

III-2-2- Influence de la dose d'antibiotique

L'étude de l'effet de la dose d'antibiotique sur la libération a été effectuée sur des ciments chargés avec 3 % et 9 % de fusidate de sodium. La figure IV-15 présente l'évolution des courbes de libération pour les deux ciments chargés avec deux doses différentes d'antibiotique. Les résultats obtenus indiquent que les ciments chargés avec 3 % de fusidate (CSF8-3%-Frais) possèdent une vitesse de libération plus importante que les ciments chargés avec 9 % de fusidate (CSF8-9%-frais). Cette remarque a été confirmée par le calcul de $t_{20\%}$ pour ces deux ciments : celui-ci est de 10 jours pour CSF8-3%-Frais et est de 15 jours pour CSF8-9%-Frais. La détermination des facteurs statistiques f_1 et f_2 (Tableau IV-12), confirme le fait que ces deux cinétiques sont statistiquement différentes ($f_1 > 15$ et $f_2 > 50$).

L'application du modèle de Peppas (Tableau IV-13) montre que pour CSF8-9%-Frais le PA est libéré par un mécanisme de diffusion ($n < 0,5$). Pour CSF8-3%-Frais, la valeur de $n > 0,5$ montre que les mécanismes de libération impliqués ne sont pas uniquement dû à des phénomènes de diffusion mais à une combinaison de mécanismes plus complexes. L'application du modèle de Kopcha conduit à une valeur de $A/B > 1$ dans les deux cas et montre ainsi que les phénomènes d'érosion sont mineurs par rapport aux phénomènes de diffusion.

Tableau IV-12 : Paramètres de différence et de similitude des cinétiques obtenues en fonction de la dose (3 % ou 9 %) de fusidate de sodium introduite dans le ciment.

	CSF8-3% - CSF8-9%	Spécifications
f_1	20,6	0 – 15
f_2	61,1	50 – 100

Tableau IV-13 : Comparaison des profils de libération selon les modèles de Higuchi, Korsmeyer-Peppas et Kopcha pour des ciments frais chargés avec 3 % (CSF8-3%-Frais) et 9 % (CSF8-9%-Frais) de fusidate de sodium.

Modèles	Paramètres	CSF8-3%-Frais	CSF8-9%-Frais
Higuchi	r^2	0,973	0,980
	a	1,404	0,894
Korsmeyer et Peppas	r^2	0,975	0,987
	n	0,530	0,419
Kopcha	r^2	0,977	0,983
	A/B	>1	>1

Tableau IV-14 : Porosité des ciments après test de libération en fonction de la dose de fusidate introduite dans le ciment (3 % ou 9 %).

	CSF8-3%-Frais	CSF8-9%-Frais
Porosité totale (%) [5 nm - 300 μm]	78	76
Microporosité (%) [5 nm - 2 μm]	75	72

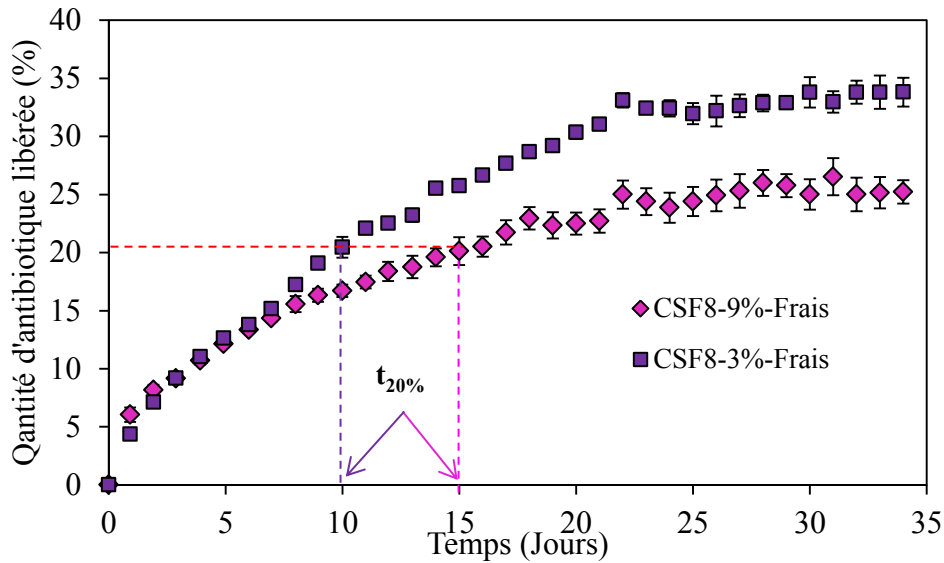


Figure IV-15 : Cinétique de libération à partir des ciments frais incluant une dose différente de fusidate de sodium (3 % ou 9 %).

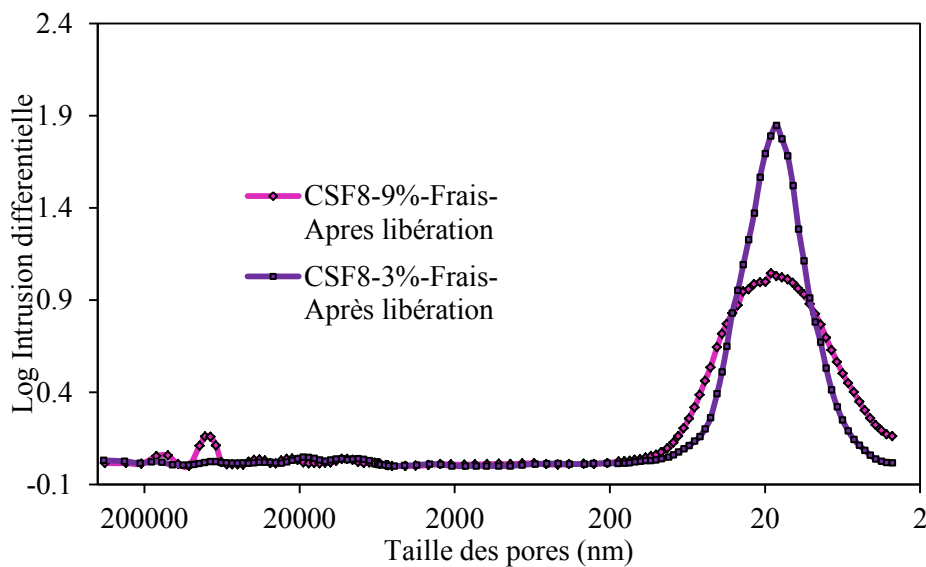


Figure IV-16 : Courbes de distribution de la taille des pores dans les ciments frais chargés avec 3% (CSF8-3%) ou avec 9% (CSF8-9%) de fusidate de sodium après le test libération.

III-2-3- Influence de la nature de l'antibiotique

L'influence de la nature de l'antibiotique sur sa libération à partir des ciments frais a été examinée. La figure III-17 présente la courbe de libération d'un ciment chargé avec 3 % d'acide fusidique (CFA8-3%-Frais) comparé à celle d'un ciment chargé avec 3 % de fusidate de sodium (CSF8-3%-Frais).

Comme nous l'avons vu précédemment pour les ciments secs, la vitesse de libération du fusidate de sodium est plus rapide que celle de l'acide fusidique. Les valeurs des $t_{20\%}$ ont été déterminées pour les deux ciments : celles-ci sont de 10 jours pour CSF8-3% et de 14 jours pour CFA8-3%. Cette différence au niveau de $t_{20\%}$ est confirmée par les coefficients de similitude ($f_1 > 15$) et différence ($f_2 > 50$) reportés dans le Tableau IV-15.

Les valeurs du coefficient n ($n > 0.5$) obtenus par l'application du modèle de Peppas (Tableau IV-16) montrent que la libération du PA ne s'effectue pas uniquement par des mécanismes de diffusion mais probablement par la combinaison de plusieurs mécanismes plus complexes. Le modèle mathématique de Kopcha (Tableau IV-16) montre qu'il n'y a pas d'érosion des ciments au cours de la libération ($A/B > 1$).

L'analyse microstructurale montre que la porosité (Tableau IV-17) ainsi que la taille des pores (Figure IV-18) du ciment CFA8-3%-Frais sont plus importantes que celles du ciment CSF8-3%-Frais, mais le taux d'antibiotique libéré à partir de ce dernier est plus important dans le cas du ciment chargé en fusidate de sodium ; cette observation atteste que ce n'est pas uniquement la microstructure qui influe sur la libération du PA mais aussi sa solubilité. Dans ce cas la solubilité semble être le facteur prédominant dans la cinétique de libération.

Tableau IV-15 : Paramètres de différence et de similitude des cinétiques obtenues pour des ciments frais chargés avec 3% de fusidate (CSF8-3%) et 3 % d'acide fusidique (CFA8-3%).

	CFA8-3% - CSF8-3%	Spécifications
f_1	16,1	0 – 15
f_2	69,2	50 – 100

Tableau IV-16 : Comparaison des profils de libération avec les modèles de Higuchi, Korsmeyer-Peppas et Kopcha pour des ciments frais chargés avec 3% de fusidate (CSF8-3%-Frais) et 3% d'acide fusidique (CFA8-3%-Frais)

Modèle	Paramètres	CFA8-3%-Frais	CSF8-3%-Frais
Higuchi	r^2	0,995	0,973
	a	1,845	1,404
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,966	0,975
	n	0,605	0,530
Kopcha	r^2	0,956	0,977
	A/B	>1	>1

Tableau IV-17 : Porosité des ciments chargés avec 3% de fusidate (CSF8-3%-Frais) ou avec 3% d'acide fusidique (CAF8-3%-Frais) après test de libération.

	CSF8-3%-Frais	CAF8-3%-Frais
Porosité totale (%) [5 nm - 300 µm]	78	79
Microporosité (%) [5 nm - 2 µm]	75	72

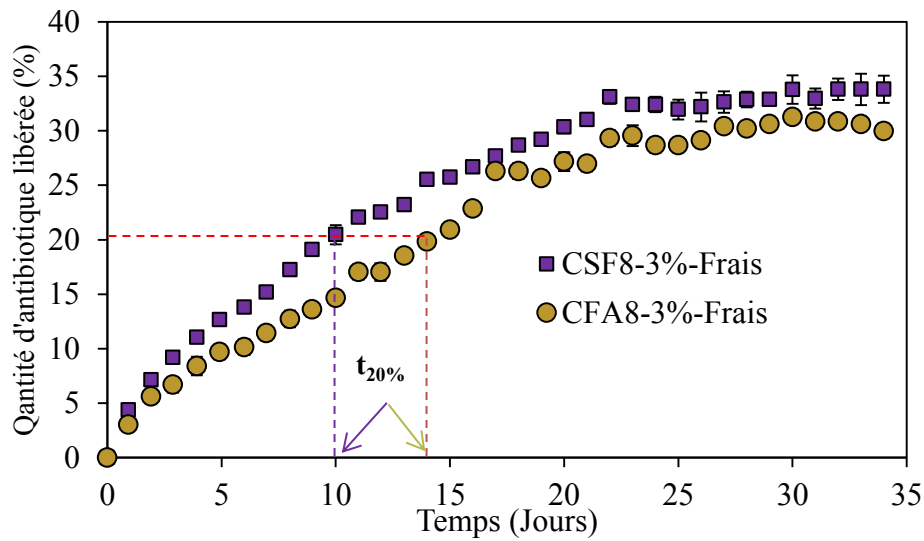


Figure IV-17 : Comparaison des profils de libération des ciments frais chargés avec 3% de fusidate (CSF8-3%-Frais) ou avec 3% d'acide fusidique (CAF8-3%-Frais).

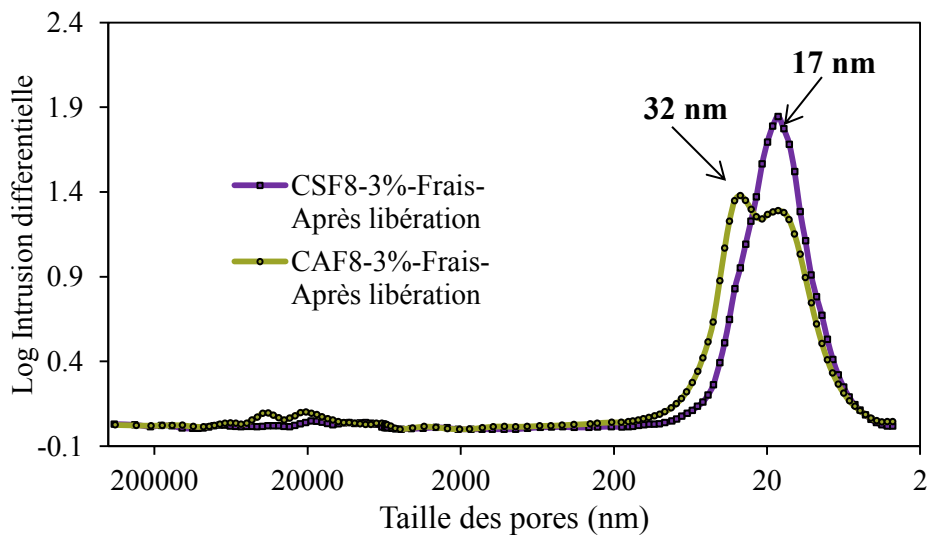


Figure IV-18 : Courbes de distribution de la taille des pores pour des ciments frais chargés avec 3 % de fusidate (CSF8-3%-Frais) ou avec 3 % d'acide fusidique (CAF8-3%-Frais) après les tests de libération.

III-2-4- Influence du rapport L/S

L'influence du rapport L/S sur la libération de l'antibiotique à partir des ciments frais a été examinée sur des ciments chargés avec 3 et 9 % de fusidate de sodium. Les courbes de libération obtenues en faisant varier le rapport L/S pour les ciments chargés avec 3 et 9 % de SF sont respectivement présentées sur les Figures IV-19 et IV-20. Comme nous l'avons vu précédemment dans le cas des ciments secs, le taux d'antibiotique libéré augmente lorsqu'on le rapport L/S passe de 0,7 à 0,8. Dans le cas du CSF3%, le pourcentage libéré passe de 26 % à 32 % ; dans le ciment CSF9%, ce taux passe de 23 % à 26 %. La vitesse de libération évaluée par $t_{20\%}$, augmente lorsque le rapport L/S augmente. Les ciments qui possèdent un rapport L/S = 0,8 (CSF8-3% et CSF8-9%) mettent respectivement 10 et 15 jours pour libérer 20 % du principe actif, contre 17 et 22 jours seulement pour les ciments préparés avec un rapport L/S = 0,7 (CSF7-3% et CSF7-9%). L'utilisation des facteurs statistiques f_1 et f_2 (Tableau IV-18) pour les deux ciments, confirme la différence observée entre les cinétiques de libération pour les deux ciments ($f_1 > 15$).

L'utilisation des modèles mathématiques établis par Higuchi, Korsmeyer-Peppas et Kopcha (Tableau IV-19), permet de préciser le mécanisme qui gouverne la libération à partir de ces ciments. Dans le cas du ciment CSF9%, et quel que soit le rapport L/S utilisé, la valeur de « n » déterminée en appliquant le modèle de Korsmeyer-Peppas montre que les mécanismes impliqués dans la libération du PA sont principalement dus à des mécanismes de diffusion. Les valeurs de « a » obtenues par l'application du modèle de Higuchi montrent que CSF8-9% diffuse plus rapidement que CSF7-9%. Dans le cas du ciment CSF3%, l'application du modèle de Korsmeyer-Peppas montre que la libération du PA à partir du ciment CSF8-3% est régie par le phénomène de diffusion ($n < 0,5$), tandis qu'il s'agit de phénomènes plus complexes pour le ciment CSF7-3%. L'application du modèle du Kopcha sur tous les ciments, et quel que soit le rapport L/S, montre que si phénomène d'érosion il y a, celui-ci est largement négligeable et que la libération s'effectue majoritairement par diffusion du principe actif à travers le volume poreux des ciments.

L'analyse microstructurale des ciments par porosimétrie à mercure permet aussi d'expliquer la différence entre les cinétiques de libération à partir des deux ciments. L'augmentation du pourcentage d'antibiotique libéré est lié au fait que le réseau poreux (porosité, taille des pores) des ciments élaborés avec L/S = 0,8 est plus important que celui des ciments élaborés avec L/S = 0,7 (Tableau IV-20 et Figures IV-21 et IV-22).

Tableau IV-18 : Paramètres de différence et de similitude des cinétiques obtenues pour des ciments chargés avec 3 % et 9 % de fusidate de sodium en fonction du rapport L/S.

	CSF7-9% - CSF8-9%	CSF7-3% - CSF8-3%
f_1	20,6	27,1
f_2	72,4	60,8

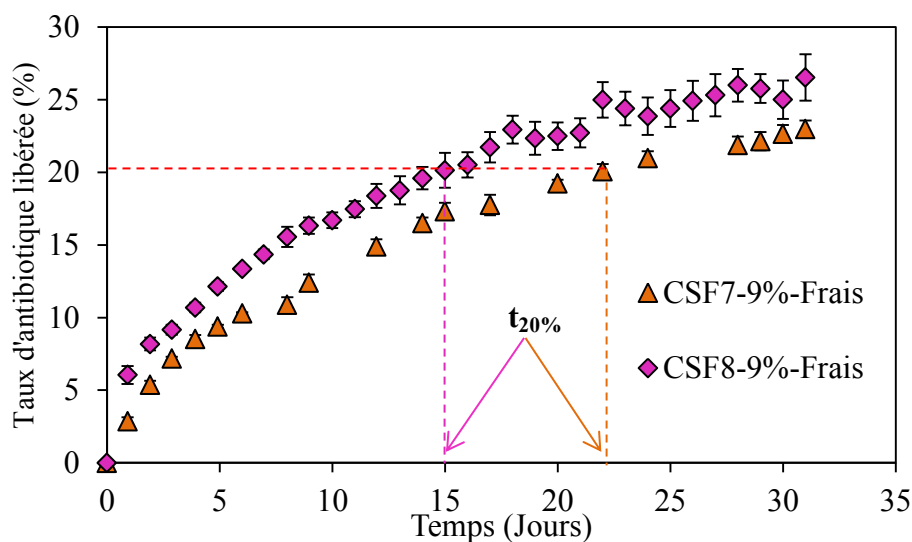


Figure IV-19 : Cinétique de libération des ciments frais chargés avec 9 % de fusidate de sodium en fonction du temps et du rapport L/S.

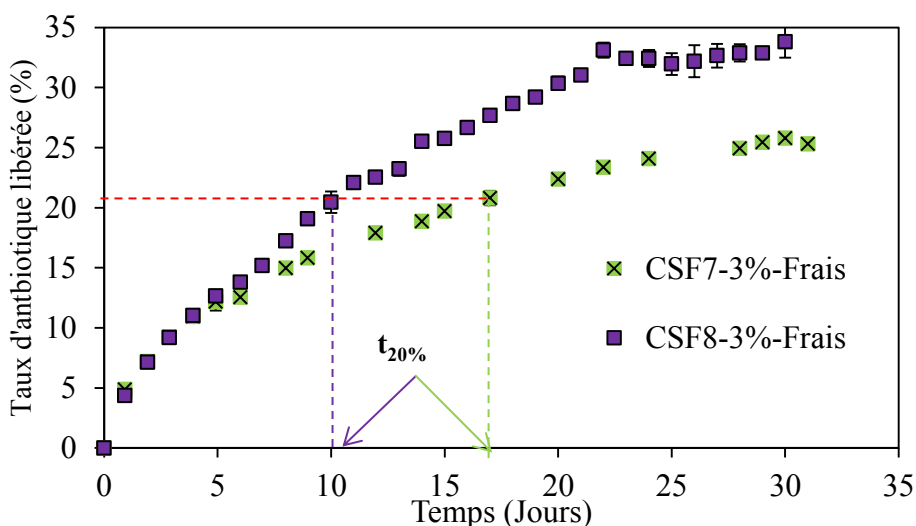


Figure IV-20 : Cinétique de libération des ciments frais chargés avec 3 % de fusidate de sodium en fonction du temps et du rapport L/S.

Tableau IV-19 : Comparaison des profils de libération suivant les modèles de Higuchi, Korsmeyer-Peppas et Kopcha pour des ciments frais chargés avec 3 % ou 9 % de fusidate des sodium en fonction du rapport L/S.

Modèle	Paramètres	CSF3%		CSF9%	
		CSF7-3%-Frais	CSF8-3%-Frais	CSF7-9%-Frais	CSF8-9%-Frais
Higuchi	r^2	0,991	0,973	0,991	0,980
	a	0,873	1,404	0,849	0,894
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,994	0,975	0,993	0,987
	n	0,426	0,530	0,493	0,419
Kopcha	r^2	0,991	0,977	0,993	0,983
	A/B	>1	>1	>1	>1

Tableau IV-20 : Porosité des ciments frais chargés avec 3 % et 9 % de fusidate en fonction du rapport L/S et après test de libération.

	CSF7-3%- Frais	CSF8-3%- Frais	CSF7-9%- Frais	CSF8-9%- Frais
Porosité totale (%) [5 nm - 300 μm]	73	78	74	76
Microporosité (%) [5 nm - 2 μm]	70	75	71,	72

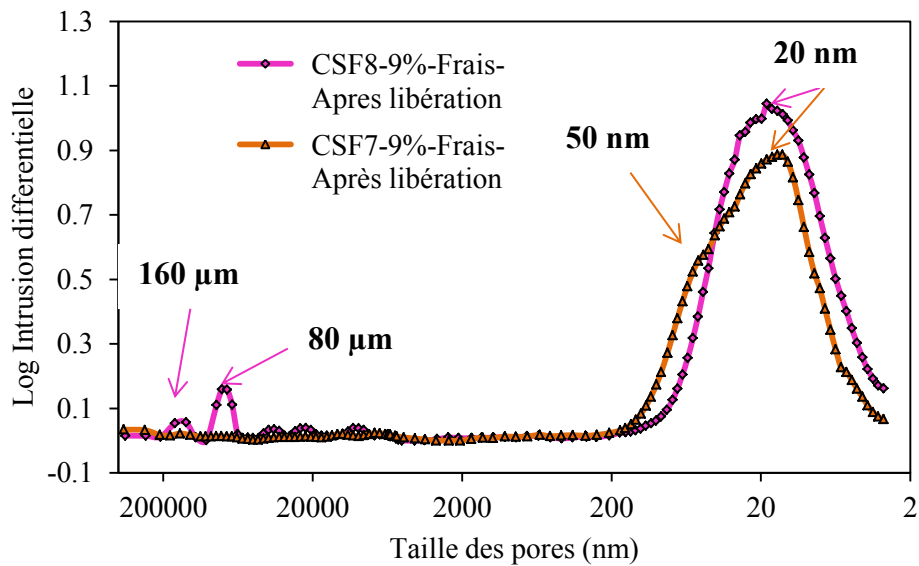


Figure IV-21 : Courbes de distribution de la taille des pores pour les ciments frais chargés avec 9 % de fusidate de sodium en fonction du rapport L/S et après les tests de libération.

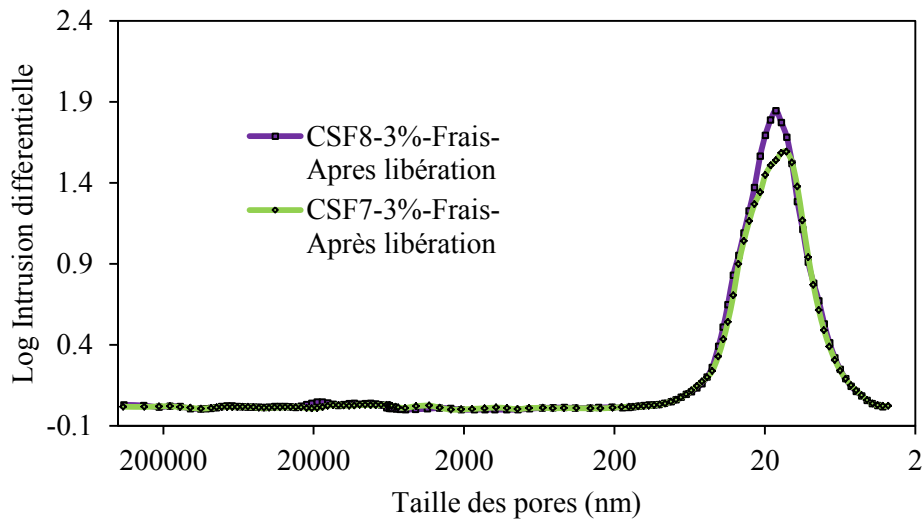


Figure IV-22 : Courbes de distribution de la taille des pores pour les ciments frais chargés avec 3 % de fusidate de sodium en fonction du rapport L/S et après les tests de libération.

III-3- Etude de la dissolution du ciment

L'étude de la dissolution des ciments $\text{CaCO}_3\text{-CaP}$ a plusieurs objectifs. D'un point de vue fondamental, elle devrait permettre de mieux appréhender la composition et le comportement de ces ciments en milieu aqueux à pH et température physiologiques (solubilité, évolution physicochimique). Dans cette étude on se limitera au dosage du calcium qui sera notre marqueur de la dégradation/dissolution du ciment.

III-3-1- Influence de l'état du ciment sur sa dégradation

Les résultats des cinétiques de libération du calcium à partir des ciments secs et frais (Figure IV-23) mettent en évidence deux types d'évolution : les ciments frais présentent un profil différent par rapport aux ciments secs. Les concentrations du calcium en solution pour les ciments secs restent assez faibles par rapport aux ciments frais. Ces résultats peuvent être expliqués par la différence de composition pour les deux catégories de ciments au moment de leur mise en contact avec le milieu de libération. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les ciments frais ont été mis en contact avec le milieu de libération 1h30 après leur préparation sachant qu'à ce moment-là, la réaction chimique de prise du ciment n'est pas complète. Ainsi le ciment est composé de vatérite et de brushite n'ayant pas encore totalement réagi et d'une petite quantité d'apatite formée (voir le suivi de la réaction chimique de prise au chapitre III partie B). Par contre les ciments secs ont été mis en contact avec le milieu de libération après la formation complète d'apatite au sein du ciment. Ainsi le ciment est composé seulement d'apatite et d'un peu de vatérite n'ayant pas réagi lors de la prise du ciment. La présence de la brushite, de la vatérite en grande quantité dans les ciments frais dans les premiers jours de libération rend ce dernier plus soluble que le ciment sec ; la vatérite et la brushite étant des sels de calcium plus solubles que l'apatite. Cette différence de solubilité est à l'origine de la différence observée pour la concentration du calcium libéré pour les deux catégories de ciments.

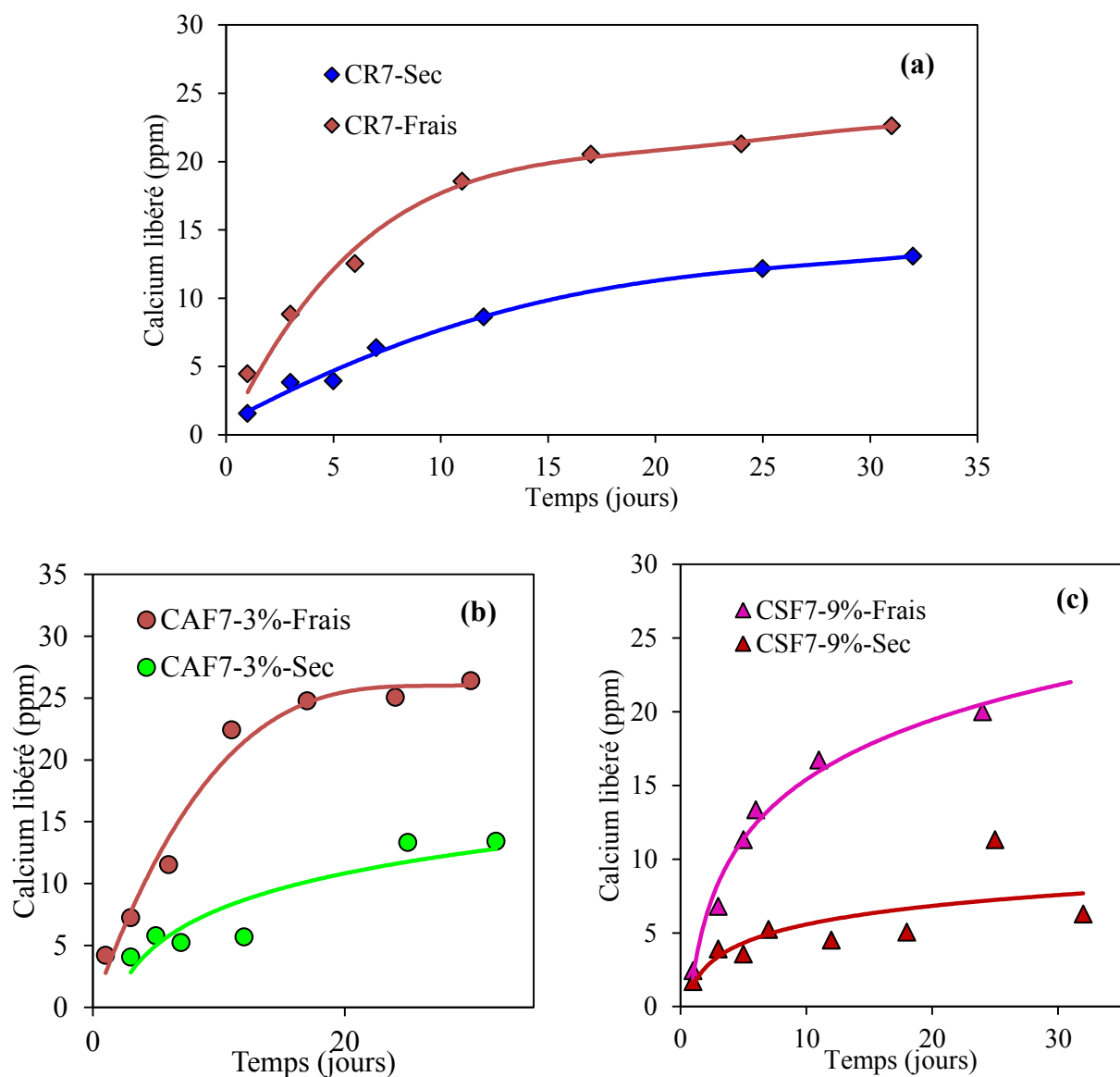


Figure IV-23: Evolution de la concentration du calcium dans le milieu de libération à partir des ciments secs ou frais : (a) ciment de référence (CR7), (b) ciments chargés avec 3 % d'acide fusidique (CSF7-3 %) et (c) ciments chargés avec 9 % de fusidate de sodium (CSF7-9 %).

III-3-2- Influence du rapport L/S sur la dissolution du ciment

L'effet du rapport L/S sur la dégradation du ciment et donc la libération du calcium à partir des ciments frais a été évalué. La figure IV-24 présente l'évolution de la concentration du calcium libéré par les trois types de ciments préparés avec différents rapports L/S. Les profils des cinétiques de dissolution des ciments étudiés n'apparaissent pas fondamentalement différents lorsqu'on modifie le rapport L/S si on exclut une petite variation observée au début du test pour le ciment chargé avec 3 % d'acide fusidique ainsi qu'une petite variation observée à la fin du test pour le ciment de référence (CR). Deux facteurs sont à considérer pour expliquer ce résultat. Le premier facteur est dû à l'effet du rapport L/S sur l'évolution de la composition du ciment lors de la réaction de prise, et le deuxième est dû à son effet sur la microstructure du ciment.

L'étude cinétique de la réaction de prise que nous avons effectuée précédemment (Chapitre III, partie B, paragraphe II-3-2-2-) sur les ciments a montré que lorsqu'on augmente le rapport L/S, on assiste à une accélération de la dissolution de la brushite et de la vatérite et par conséquent de la formation de l'apatite. Ceci nous permet de dire que lors de la réaction de prise, les ciments élaborés avec un rapport L/S égal à 0,7 contiennent plus de brushite et de vatérite et moins d'apatite que les ciments élaborés avec un rapport L/S égal à 0,8. Cette différence de composition rend les ciments élaborés avec un rapport L/S égal à 0,7 plus solubles que ceux élaborés avec L/S égal à 0,8 et par conséquent libèrent plus de calcium (la brushite et la vatérite, présentes en plus grandes quantités dans le ciment préparé avec L/S = 0,7, étant plus solubles que l'apatite).

L'analyse microstructurale quant à elle, montre que lorsqu'on augmente le rapport L/S, la porosité totale et la taille des pores augmentent. Ceci permet une diffusion facilitée du calcium à travers le volume poreux des ciments élaborés avec L/S égal à 0,8 par rapport aux ciments préparés avec L/S égal à 0,7.

La similarité de profils de libération du calcium dans ces ciments est le résultat de ces deux facteurs.

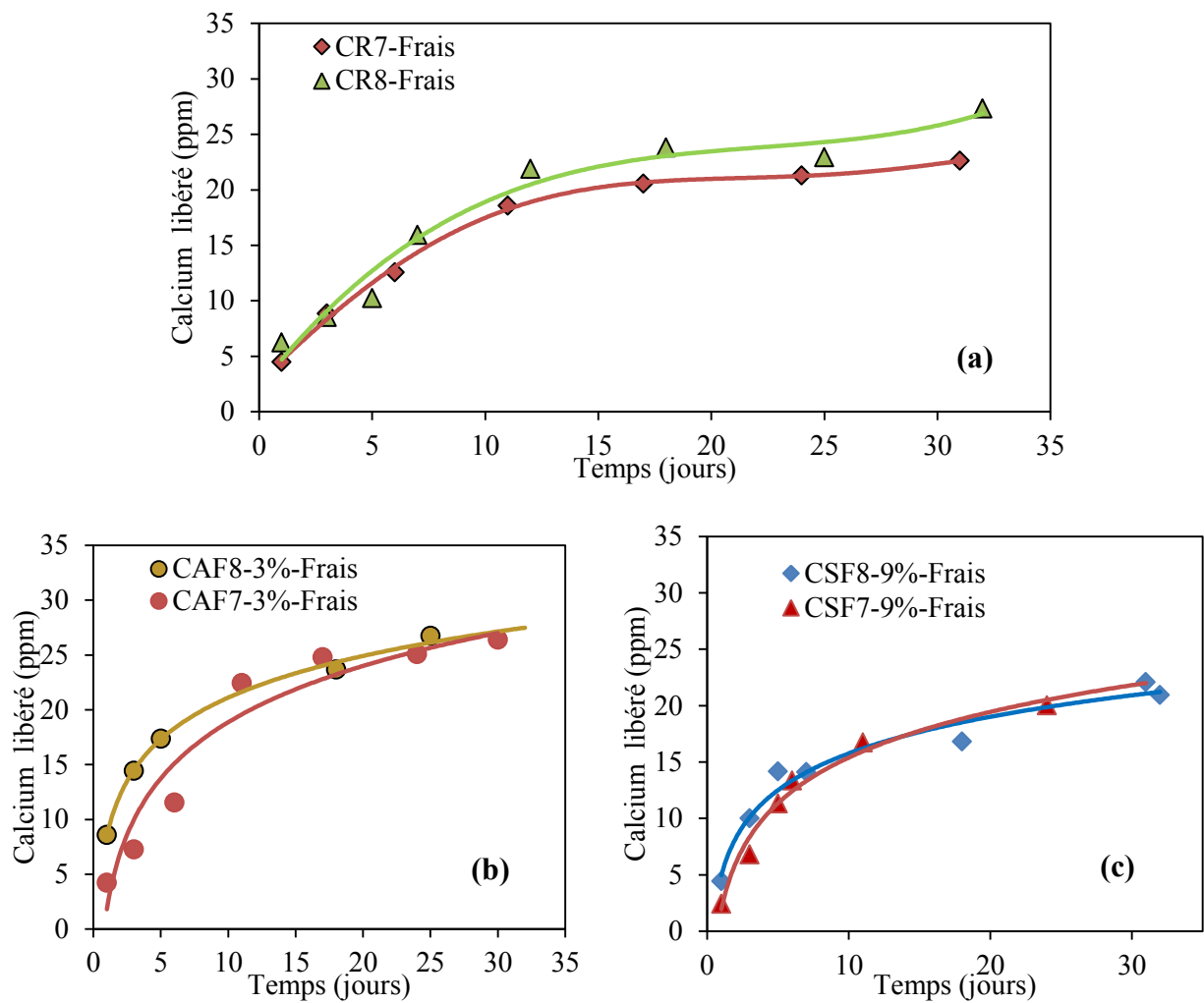


Figure IV-24 : Évolution au cours du temps de la concentration du calcium libéré à partir des ciments frais en fonction du rapport L/S : (a) ciments de référence (CR7), (b) ciments contenant 3 % d'acide fusidique (CAF7-3%), et (c) ciments chargés avec 9% de fusidate de sodium (CSF7-3%).

III-4- Caractérisation des ciments après le test de dissolution

III-4-1- Diffraction des rayons X

Les diagrammes de diffraction de rayons X des ciments avant et après quatre semaines d'immersion dans le milieu de libération/dissolution sont présentés sur la figure IV-25. Il est à noter que les diagrammes ont été normalisés par rapport à une raie caractéristique de l'apatite située à une valeur de deux theta d'environ 30 degrés.

Les diagrammes montrent qu'aucune phase étrangère cristallisée n'a été formée ; on retrouve sur le diagramme de RX exactement les mêmes phases avant et après dissolution. En revanche, on assiste à une dissolution partielle de la vatérite au cours de l'essai. Ceci a été confirmé par une diminution de l'intensité des raies de la vatérite (situées à 29, 32, 52 et 58 degrés) pour les ciments après le test de dissolution.

III-4-2- Spectroscopie infrarouge

La figure IV-27 présente les spectres d'absorption infrarouge des ciments avant et après le test de dissolution et ce après normalisation de l'ensemble du spectre et la soustraction de la ligne de base. Les spectres des ciments analysés après le test de libération ne présentent aucune bande supplémentaire par rapport aux ciments n'ayant pas subi le test de dissolution.

Afin de suivre l'évolution des ciments au cours de l'étude de dissolution, nous avons suivi l'intensité des bandes d'absorption de la vatérite situées respectivement à 870, 1409 et 1483 cm^{-1} pour les ciments avant et après le test de dissolution (Figure IV-28). Pour cela nous avons normalisé l'ensemble du spectre par rapport à une bande caractéristique de l'apatite ($\nu = 1022 \text{ cm}^{-1}$). On note la diminution de l'intensité des bandes de la vatérite dans les ciments après dissolution. L'analyse par spectroscopie infrarouge confirme les observations faites par diffraction des rayons X.

Cette analyse met en évidence également la disparition d'une bande située à 1257 cm^{-1} caractéristique de l'antibiotique après libération dans le cas de ciments chargés avec 3 % d'acide fusidique ou de fusidate de sodium. Cette bande (C=O) est caractéristique du groupement ester de la molécule d'antibiotique. Cette bande persiste dans le cas de ciment à 9 % de fusidate de sodium ; ceci pourrait être lié à la quantité relativement importante introduite dans le ciment.

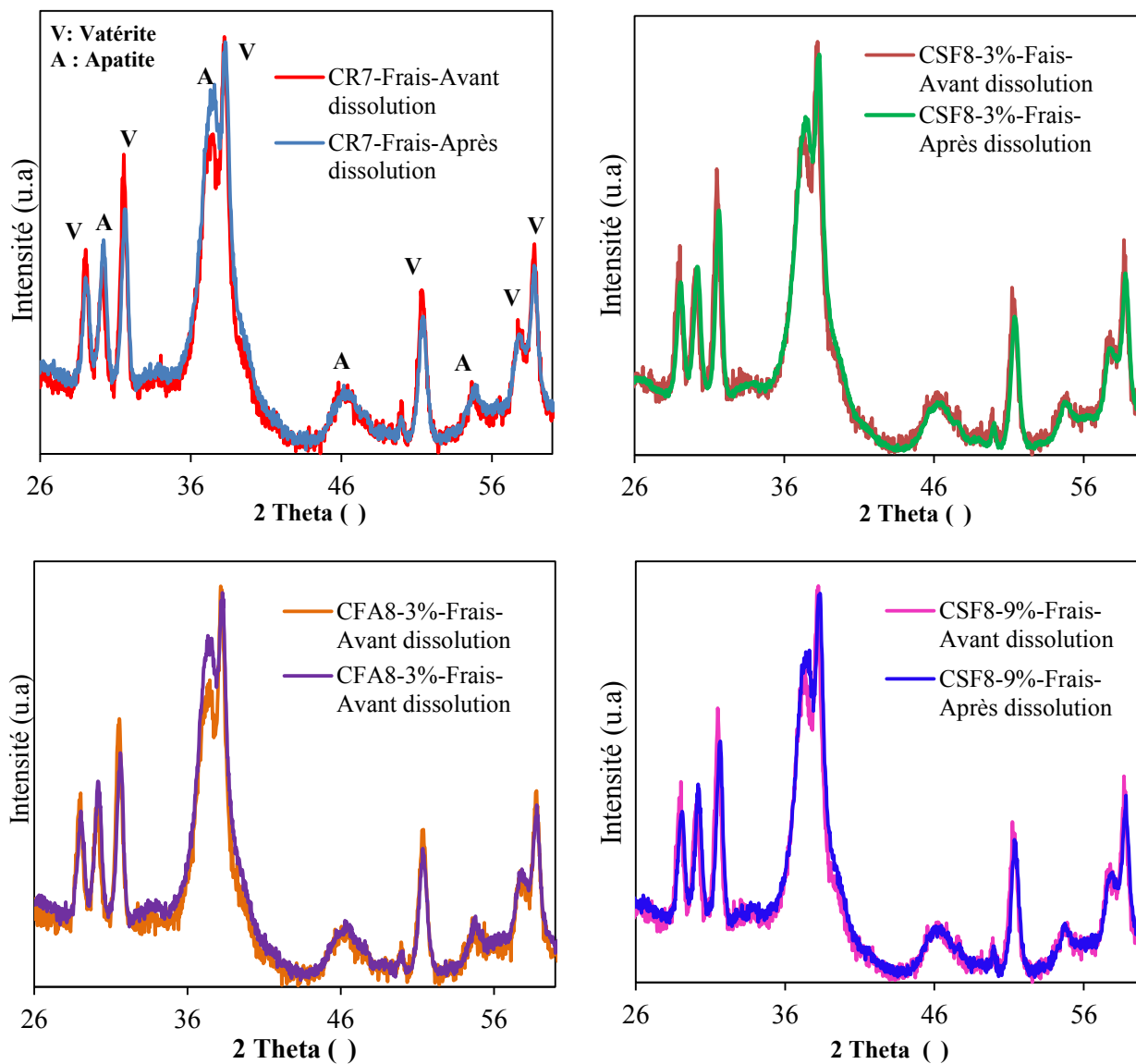


Figure IV-25: Diffractogrammes de RX des ciments CR8, CSF8-3%, CSF8-9% et CFA8-3% avant et après le test de dissolution.

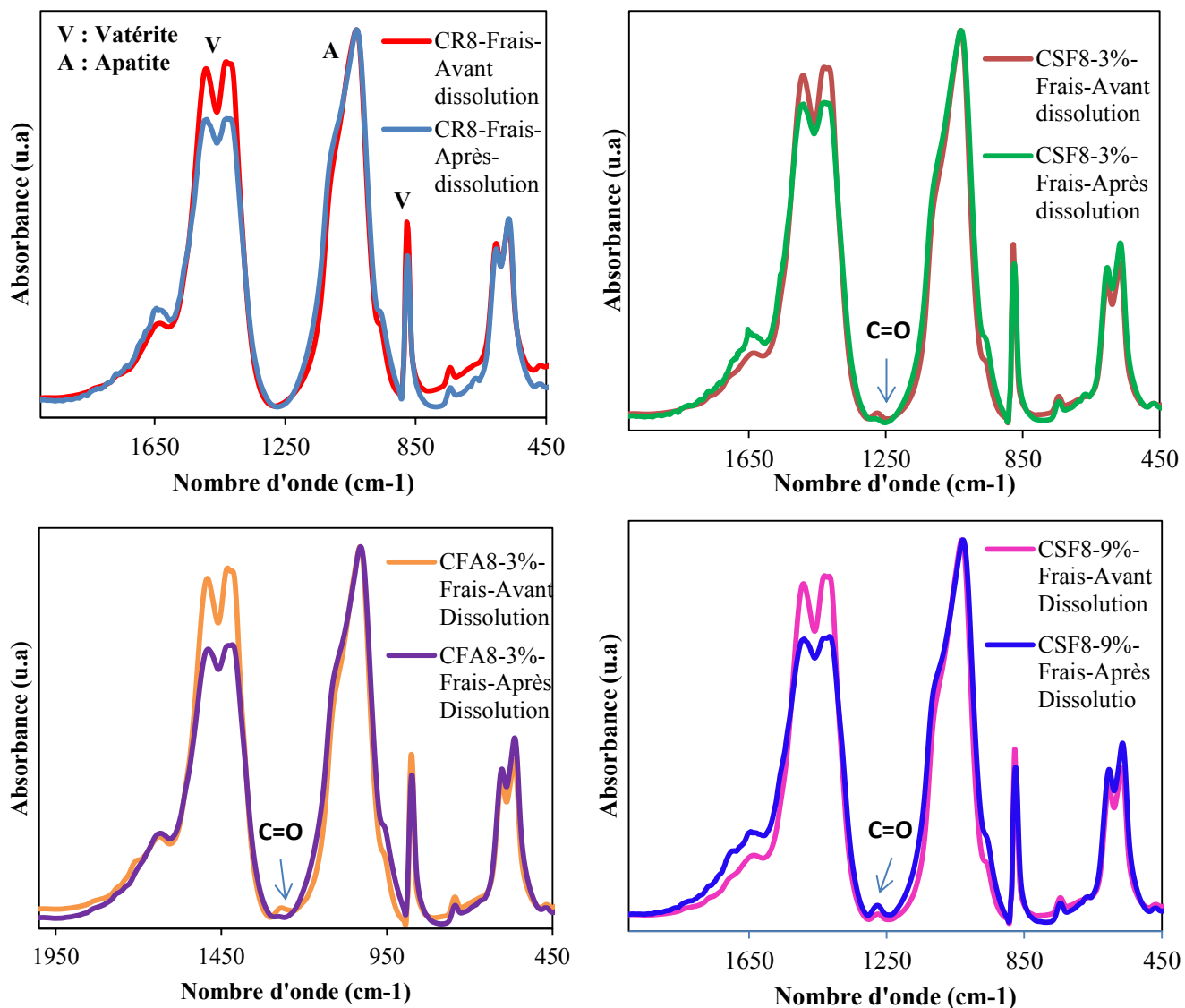


Figure IV-27 : Spectres IR des ciments CR8, CSF8-3%, CSF8-9% et CFA83% avant et après le test de dissolution.

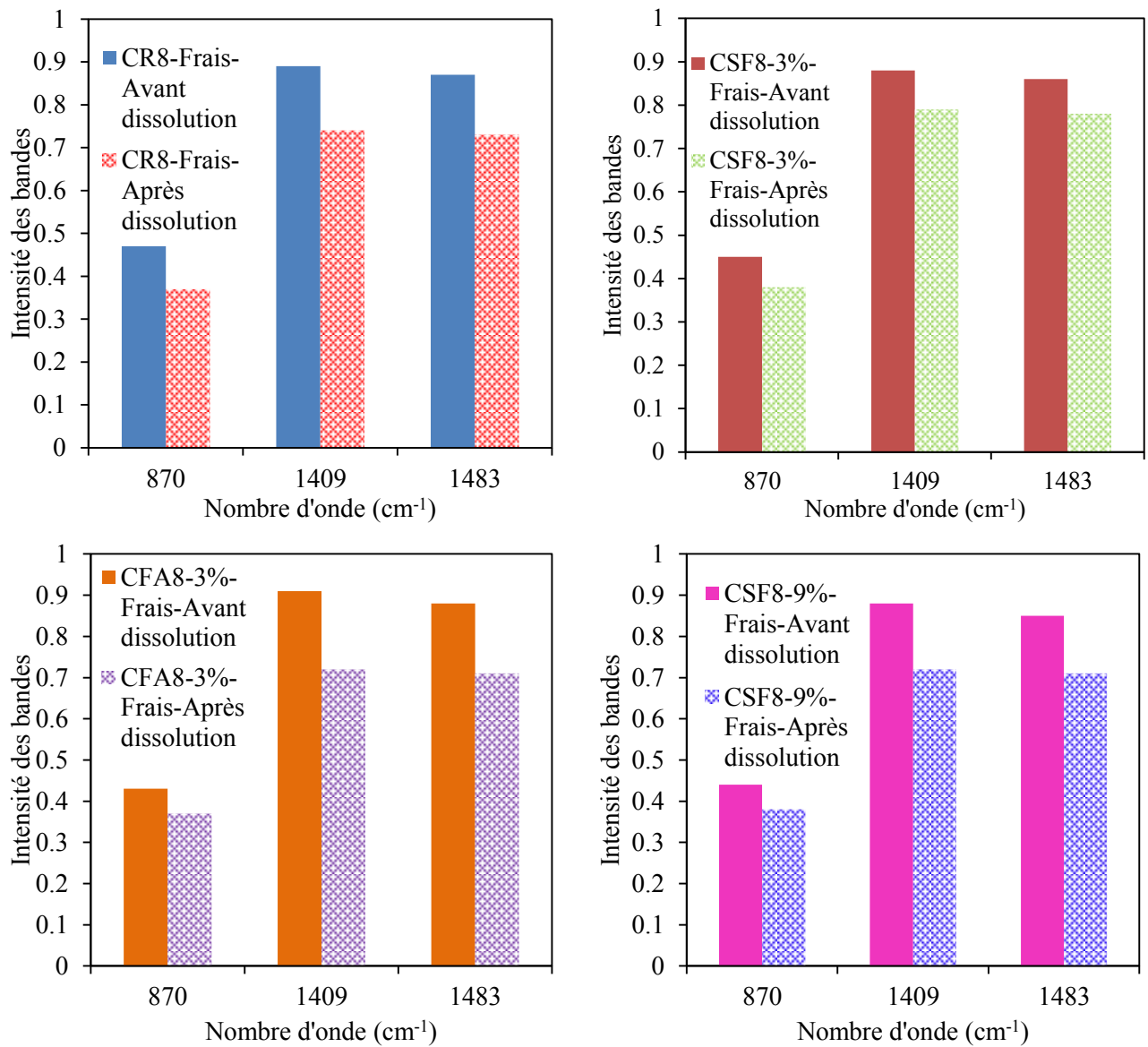


Figure IV-28: Intensités des bandes IR des groupements (CO₃) de la vatérite des ciments avant et après le test de dissolution : (a) ciment de référence, (b) ciment chargé avec l'acide fusidique (CFA8-3%) et (c, d) ciments chargés respectivement avec 3 et 9 % de fusidate de sodium (CSF8-3% et CSF8-9%).

CONCLUSION

Ce travail nous a permis de montrer que les ciments chargés avec l'antibiotique permettent d'obtenir une libération sur une période prolongée et, ce quel que soit l'antibiotique incorporé dans le ciment (acide fusidique ou le fusidate de sodium), le rapport L/S utilisé (0,7 ou 0,8) et l'état du ciment utilisé (sec ou humide).

Le taux libéré à partir des ciments chargés en fusidate de sodium est plus grand que celui noté pour les ciments chargés en acide fusidique. Pour tous les ciments examinés, l'augmentation du rapport L/S se traduit par une élévation du taux d'antibiotique libéré. L'étude comparée des profils de libération de l'antibiotique entre les ciments secs et humide montre une similitude entre les ciments examinés. Dans tous les cas examinés, les quantités d'antibiotique libérées par jour sont massives durant les deux premiers jours (de 4 à 9 mg), au-delà de cette période, la quantité relarguée est de l'ordre de 0,5 à 2 mg.

La libération du médicament a été modélisée sur la base des équations de Higuchi, Korsmeyer-Peppas, et Kopcha. Les résultats obtenus ont montré que la libération de l'antibiotique est principalement contrôlée par le mécanisme de diffusion.

L'analyse par DRX et FTIR des ciments frais avant et après libération montre une diminution de la teneur en vaterite des ciments, ce qui implique une dissolution partielle de la vaterite au cours de l'essai de libération. Par ailleurs, l'analyse par absorption atomique du milieu de libération obtenu à partir des ciments frais montre que la teneur en calcium est plus importante comparée à celle observée pour les ciments secs ; ceci est principalement dû à la différence de composition entre les deux ciments. En fait, les ciments frais sont constitués d'une plus grande proportion de brushite et vaterite lesquelles sont plus solubles que l'apatite, ce qui explique la quantité de calcium élevée dans ce cas.

Nous avons développé dans le cadre de ce travail un système de libération de l'acide fusidique et le fusidate de sodium à partir du ciment mixte CaCO_3 -CaP. Les résultats encourageants obtenus incitent à tester l'activité antibactérienne de ce système. Cette étude, bien que préliminaire, fera l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

PARTIE B

EVALUATION PRELIMINAIRE DES PROPRIETES ANTIBACTERIENNES DU CIMENT

INTRODUCTION

L'intérêt de l'introduction de l'acide fusidique ou du fusidate de sodium dans ce ciment était de lui conférer une activité antibactérienne pour lutter contre le risque d'infections osseuses.

L'objectif de cette partie du chapitre est d'étudier l'activité de ces deux formes vis-à-vis d'une bactérie.

La souche bactérienne testée est *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ; ce germe étant celui le plus fréquemment rencontré dans les infections osseuses. En effet, *S. aureus* est responsable de près de 20 % des infections nosocomiales [INVS, 2007] et de 90 % des ostéomyélites, infections de l'os et de nombreuses contaminations d'implants osseux à la surface desquels elle forme un biofilm [Karlov, 2002].

L'activité antibactérienne des ciments élaborés a été évaluée par la capacité de ces biomatériaux à empêcher l'adhésion et la prolifération de cette bactérie sous forme de biofilm à leur surface.

Dans un premier temps, nous présenterons les tests qui ont permis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de l'antibiotique sur *S. aureus*. Ensuite, nous décrirons la préparation des pastilles de ciment chargées en antibiotique, puis la méthodologie suivie pour réaliser les essais antibactériens sur ces biomatériaux et enfin nous discuterons les résultats obtenus.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne présentée dans ce travail a été réalisée par l'équipe du Pr Christine Roques au sein du Laboratoire de Génie Chimique de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse.

I- Protocoles expérimentaux

II-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrice et bactéricide de l'antibiotique

L'activité antibactérienne des ciments élaborés a été évaluée en utilisant la souche de référence *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 (collection de l'Institut Pasteur, Paris, France).

Avant l'évaluation des effets anti-biofilm des ciments, les activités antimicrobiennes des antibiotiques incorporés à ces derniers ont été mesurées en déterminant leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI définie comme étant la plus faible concentration permettant d'empêcher le développement total des bactéries) et leurs concentrations minimales bactéricides (CMB définie comme étant la plus faible concentration permettant de tuer plus de 99 % d'une population bactérienne). Une gamme de dilutions de raison 2 de chaque molécule à tester a été réalisée à partir de 100 µL d'une solution mère (3,90 µg/mL) diluée dans 100 µL de bouillon Trypticase Soja dans le premier puits d'une microplaque 96 puits. Le DMSO (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), solvant utilisé pour la solubilisation de l'acide fusidique (3,90 µg/mL) a été testé de la même façon afin de mesurer son activité microbienne propre. Un

inoculum bactérien a été préparé à partir d'une culture de 18-24 h, en ajustant la concentration à l'aide d'un spectrophotomètre (Secomam), à 10^8 bactéries/mL. Les microplaques ont ensuite été ensemencées de façon à obtenir environ 10^6 bactéries/mL dans chaque puits à l'aide d'un inoculateur multipoint (Denley). Après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose, les CMI ont été déterminées comme les concentrations les plus faibles, sans trouble visible dans le bouillon de culture. Des témoins positifs (contrôle de croissance) et négatifs (contrôle de stérilité) ont été réalisés dans des milieux sans ajout d'antibiotiques ou de DMSO et respectivement ensemencés ou non avec les bactéries. Les CMB ont été déterminées par l'absence de croissance microbienne macroscopique après repiquage sur gélose Trypticase Soja des cultures ayant servi à déterminer les CMI et incubation pendant 24 h à 37°C en aérobiose. Tous les essais ont été réalisés en duplicat pour chaque concentration d'antibiotique ou de DMSO.

I-2- Essai anti-biofilm

I-2-1- Préparation de pastilles de ciments

Les pastilles de ciments ($h = 5$ mm ; $\varnothing = 10$ mm) utilisées pour ce test ont été préparées selon les protocoles décrits dans le paragraphe II-1 du chapitre II pour le ciment de référence et dans le paragraphe I-1 du chapitre III pour les ciments chargés en acide fusidique (FA) ou en fusidate de sodium (SF). Une quantité (2 g) de pâte du ciment a été préparée, subdivisée en 5 portions puis placées dans des petits moules en silicone (10 mm de diamètre x 5 mm hauteur). Les moules ont été ensuite enfermés dans un pilulier en présence d'un papier imbibé d'eau pour créer une atmosphère saturée en eau et le tout a été placé dans une étuve à 37°C pendant 48 heures. Les pastilles sont ensuite séchées pendant 5 jours à 37 °C et enfin elles ont été stérilisées par rayons gamma (25 KGy).

Les différentes compositions des pastilles de ciments (référence, chargés en fusidate de sodium ou en acide fusidique) et élaborées à partir de 1 g de vatérite et de 1 g de brushite sont répertoriées dans le tableau IV-21, cette quantité de solide permet de préparer cinq pastilles (chaque pastille comporte à peu près 0,4 g de phase solide du ciment).

Tableau IV-21 : Composition des ciments préparés pour les tests microbiologiques : masses du liquide (m_l), du solide (m_s) et de l'antibiotique (m_{AB}) FA ou SF.

Ciment	Antibiotique % (m_{AB}/m_s)	Masse de phase solide (m_s)			Masse de phase liquide (m_l)	
		Vatérite (g)	Brushite (g)	FA (g)	SF (g)	Eau (g)
CR	0	1	1	-	-	1,40
CFA	3	1	1	0,06	-	1,44
CSF	3	1	1	-	0,06	1,40
CSF	9	1	1	-	0,18	1,40

I-2-2- Test anti-biofilm

Afin de mesurer l'activité anti-biofilm des ciments contenant des antibiotiques, ceux-ci ont été placés dans des conditions permettant spécifiquement la formation de communauté bactériennes adhérentes. Les pastilles de ciment ont été immergées stérilement dans les puits d'une plaque 24 puits contenant 2 mL de bouillon biofilm modifié ((NH₄)₂SO₄ 0,1 g/L ; MgSO₄, 2H₂O 0,2 g/L ; FeSO₄ 7H₂O 0,0005 g/L ; Na₂HPO₄ 1,25 g/L ; KH₂PO₄ 0,5 g/L, glucose 0,05 g/L) [Khalilzadeh et al., 2010]. Un inoculum bactérien a été préparé à partir d'une culture de 18-24 h, en ajustant la concentration à l'aide d'un spectrophotomètre (Secomam), puis par dilutions de raison 10, de telle sorte que la concentration finale en microorganismes soit de 10² bactéries/mL dans chaque puits.

Le bouillon a été renouvelé après deux rinçages délicats à l'eau distillée stérile aux temps 2 h, 4 h, 6 h, 20 h, 24 h et 48 h. La composition du milieu, son renouvellement et la concentration de l'inoculum favorisent l'adhésion et la formation de biofilms au dépend du développement de bactéries planctoniques.

Les biofilms ont été cultivés pendant 72 h en aérobiose et à la fin du temps d'incubation, les pastilles de ciment ont été de nouveau rincées délicatement deux fois à l'eau distillée stérile pour éliminer la présence potentielle de quelques bactéries planctoniques. Les bactéries adhérentes ont été collectées en grattant les pastilles de ciment avec une spatule stérile. La suspension a alors été diluée dans une gamme de raison 10 et inoculée par incorporation en géloses Trypticase Soja permettant ainsi de quantifier le développement de biofilms en termes de nombre de bactéries présentes à la surface du ciment. La numération est réalisée après une incubation de 48 h à 37 °C en aérobiose. Chaque condition a été testée sur trois essais indépendants.

II- Résultats et discussion

II-1- Détermination des CMI et CMB

Le tableau VI-22 présente les valeurs obtenues pour l'acide fusidique (FA) et le fusidate de sodium (SF). L'acide fusidique présente une activité antimicrobienne, de type inhibition de croissance jusqu'à la concentration 0.008 µg/mL et une activité bactéricide est détectée à 0.030 µg/mL. Le fusidate de sodium présente une activité inhibitrice de croissance et bactéricide à des concentrations similaires (0.030 µg/mL).

Tableau IV-22 : Valeurs des CMI et CMB (µg/mL) de l'acide fusidique et du fusidate de sodium vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus*.

	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMB/CMI
FA	0,008	0,03	4
SF	0,03	0,03	1

II-2- Evaluation de l'activité antibactérienne des ciments

La figure IV-29 présente les résultats obtenus sur l'évaluation de l'activité antibactérienne de ciment de référence (CR), des ciments chargés avec 3% d'acide fusidique (CFA3%) ou avec 3 et 9% de fusidate de sodium (CSF3% et CSF9%) en termes de population adhérente (UFC¹²/mL de liquide de grattage). Le ciment CR ne présente pas d'activité antibactérienne significative : même densité microbienne après 72 heures d'incubation que les témoins puits de microplaque – et autorise la formation d'un biofilm dense à sa surface, avec une population adhérente supérieure à 7.10^6 UFC/mL. Les ciments chargés en antibiotique induisent une colonisation plus faible de la surface des ciments (3 à 5.10^6 UFC/mL), mais celle-ci reste supérieure à 6 log d'UFC/mL. Il est à noter que l'acide fusidique possède une activité antibactérienne meilleure que celle du fusidate de sodium mais cette différence est non significative. De la même manière, le nombre de *S. aureus* adhérents est plus faible pour les ciments chargés en fusidate de sodium à 9% par rapport à ceux à 3% ce qui montre un léger effet de la dose d'antibiotique incorporée au ciment.

Cette faible activité des ciments chargés en antibiotique sur le biofilm pourrait être expliquée par son mode d'action. L'acide fusidique est un anti-staphylococcique qui agit par inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique et donc stoppe la synthèse protéique. Il est donc typiquement considéré comme un inhibiteur de la croissance. Le ratio CMB/CMI de 4 observé correspond à cette notion. Dans le cas du fusidate de sodium, la CMI est plus élevée avec au final des valeurs de CMI et CMB comparables. La formation de biofilm est caractérisée par une première phase d'adhésion à la surface suivie par une multiplication des bactéries adhérentes. Nos résultats semblent indiquer que l'acide fusidique ou son sel de sodium aux doses testées ne permettent pas de diminuer significativement la capacité d'adhésion de *S. aureus* aux ciments, ni la croissance secondaire des bactéries adhérentes conduisant au final à une colonisation de niveau élevée, même si légèrement inférieure à celle des ciments non chargés. Ces molécules présentent donc peu d'intérêt dans ce type d'application. Il resterait à définir l'intérêt potentiel d'une telle approche locale en complément d'une antibiothérapie systémique.

¹² UFC pour « Unité Formant Colonie », une UFC correspond donc à une colonie de bactéries.

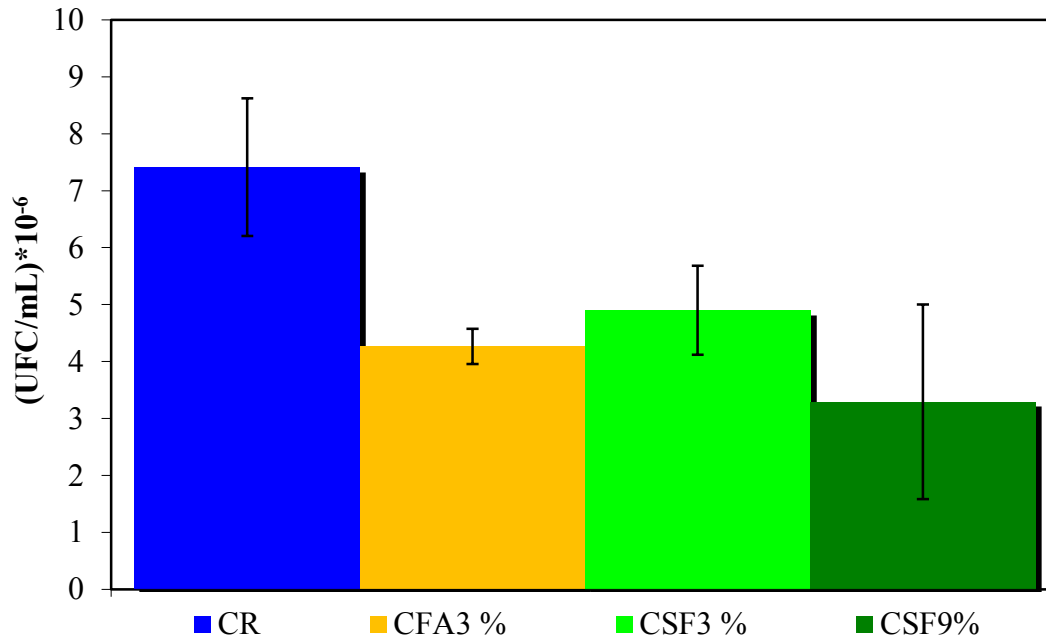


Figure IV-291 : Evolution de l'activité antibactérienne des ciments exprimée en UFC/mL de *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSION

La première partie de ce chapitre a porté sur la libération du principe actif à partir de ciment CaCO₃-CaP. Cette étude montre que les ciments examinés permettent d'obtenir une libération prolongée de l'antibiotique. Les doses libérées sont de l'ordre de 0,5 à 2 mg par jour, doses largement supérieur à la CMI et la CMB de cet antibiotique.

L'étude préliminaire de l'activité antibactérienne réalisée sur ces ciments chargés en antibiotique montre une activité antibactérienne faible vis-à-vis de la *S.aureus*. Cette faible activité sur le biofilm pourrait être expliquée par le mode d'action de l'acide fusidique, considéré comme inhibiteur de la croissance. Il serait intéressant de tester l'activité antibactérienne de ces ciments sur d'autres souches (bactéries planctoniques).

CONCLUSION GENERALE

Ce travail avait pour objet de valoriser le ciment mixte à base de phosphate et carbonate de calcium $\text{CaCO}_3\text{-CaP}$ utilisé pour le comblement osseux en lui conférant un rôle supplémentaire de support pour un antibiotique. Ce ciment a été élaboré à partir d'un mélange équimassique de vatérite et de brushite ; ces deux poudres réactives ont été synthétisées et caractérisées dans le cadre de ce travail de thèse. Le mécanisme de formation du ciment passe par la dissolution des réactifs suivie d'une précipitation, ce qui conduit à la formation d'une nouvelle phase. La composition finale du ciment $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$ telle que déterminée par DRX, spectroscopie FTIR et MEB est constituée d'une apatite nanocristalline analogue au minéral osseux associée à de la vatérite introduite en excès en tant que réactif.

Nous avons examiné l'effet de l'association de l'antibiotique avec le ciment mixte $\text{CaCO}_3\text{-CaP}$ sur les propriétés physicochimiques du produit final, et ce en termes de cinétique de réaction de prise et de temps de prise, d'injectabilité et de propriétés mécaniques. Pour cela, le rapport liquide/solide, la dose d'antibiotique et l'ajout d'un accélérateur de prise, ont été pris comme variables expérimentales.

Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués lors de la réaction de prise de ce ciment, nous avons adapté une technique d'analyse semi-quantitative par spectroscopie FTIR, et diffraction des RX. Cette technique nous a permis d'évaluer l'évolution de la composition en brushite, en vatérite et en apatite des ciments de référence ou chargés en antibiotique au cours du temps. Les cinétiques de dissolution de la brushite et de formation de l'apatite obtenues par des données de DRX ont été en parfait accord avec les résultats issus des analyses par spectroscopie FTIR, appuyant leur pertinence en termes de quantification. L'ajout de fusidate de sodium dans le ciment entraîne une dissolution rapide de la vatérite et de la brushite et par conséquent une accélération de la formation de l'apatite ; l'ajout de l'acide fusidique pratiquement insoluble dans l'eau ne semble pas avoir quant à lui d'effet significatif sur la cinétique de prise du ciment.

Le temps de prise a été également affecté par l'incorporation de l'antibiotique dans le ciment. Deux effets antagonistes ont été observés lors de l'ajout de ces deux formes d'antibiotique. L'introduction du fusidate de sodium s'accompagne d'une diminution du temps de prise, tandis que l'acide fusidique l'augmente. L'ajout d'un accélérateur de prise (Na_2HPO_4) réduit le temps de prise d'une manière significative, et a permis d'atteindre un temps de prise de l'ordre de 25 à 30 minutes celui-ci se situe dans une gamme compatible avec une application en chirurgie orthopédique ou dentaire.

La modification de la porosité totale et de la résistance à la compression des ciments secs peut être reliée à la fois à l'introduction de l'antibiotique et au rapport L/S : l'augmentation de ce dernier paramètre augmente la porosité, ce qui se traduit par une réduction significative de la résistance à la compression des ciments. Par contre, la diminution de la porosité du ciment, suite à l'addition de l'antibiotique, n'affecte pas significativement la résistance à la compression des ciments.

L'étude comparée des propriétés mécaniques sur des ciments frais (immergés dans une solution de NaCl 0,9 %) et des ciments secs montre une diminution de la résistance à la compression des ciments frais par rapport au ciment secs et ce pour un rapport L/S de 0,7, et pas d'effet significatif pour les ciments élaborés avec L/S = 0,8.

Les mesures de l'injectabilité de la pâte ont permis de montrer que le ciment de référence $\text{CaCO}_3\text{-CaP}$ n'est pas injectable, à cause de la présence du phénomène de séparation de phases au cours de l'extrusion de la pâte du ciment, et la force à appliquer dépasse rapidement 12 kg, limite fixée pour une injection manuelle.

L'ajout de fusidate de sodium à 3 et 9 % ou de l'acide fusidique à 3 % au ciment permet d'améliorer l'injectabilité du ciment, ainsi la force nécessaire pour extruder la pâte est inférieure à 12 kg. Cependant, le phénomène de séparation de phases persiste toujours. L'augmentation du rapport L/S de 0,7 à 0,8 permet d'améliorer d'avantage l'injectabilité mais ne supprime pas le phénomène de séparation de phases dans le cas du ciment de référence ou incluant 3 % d'antibiotique. Nous montrons qu'avec une dose de 9 % de fusidate de sodium et un rapport L/S égal à 0,8, on peut s'affranchir de la séparation de phases, et la force nécessaire à l'extrusion a été nettement diminuée (1-2,5 kg).

L'étude des phénomènes physicochimiques intervenant à l'interface entre phosphates de calcium d'intérêt biologique et molécules de fusidate nous a amené dans une première étape à élaborer et caractériser deux catégories de supports : (i) l'hydroxyapatite, un support bien cristallisé et utilisé en chromatographie en phase liquide et dans la composition de matériau orthopédique et (ii) une apatite nanocristalline carbonatée analogue à la phase minérale des tissus calcifiés. Afin de préciser la nature de l'interaction entre le ciment et le principe actif une étude préliminaire de l'adsorption du fusidate par les supports apatitiques a été examinée. La réactivité des apatites préparées vis-à-vis des molécules de fusidate dépend des propriétés physico-chimiques du matériau et des caractéristiques de la solution. Bien que les apatites préparées soient de nature différente (HA, ANC, CR), les isothermes d'adsorption obtenues ont une allure de type de Freundlich. La rétention des molécules de fusidate par les cristaux apatitiques se fait selon une cinétique rapide, ce qui laisse penser à une grande réactivité adsorbant-adsorbat. Cependant, le taux d'adsorption obtenu pour les différents supports apatitiques étudiés reste assez faible et ne dépasse pas 11%.

L'étude de libération de l'antibiotique à partir du ciment $\text{CaCO}_3\text{-CaP}$, a permis de montrer que le profil de libération est prolongée sur plusieurs semaines et ce, quel que soit le mode d'ajout du médicament et le rapport L/S utilisé. Toutefois, nous montrons que la vitesse de libération de l'antibiotique dépend de la forme de l'antibiotique introduite dans le ciment et du rapport L/S : ainsi les ciments chargés en fusidate de sodium libèrent plus rapidement que les ciments chargés en acide fusidique, ceci est dû à la différence de solubilité entre les deux formes. Les ciments préparés avec L/S égal à 0,8 libèrent l'antibiotique plus vite que ceux élaborés avec L/S égal à 0,7. L'étude comparée de la libération d'antibiotique à partir des

ciments secs et humides montre une similitude entre les deux ciments. La modélisation des données de libération par plusieurs modèles permet de confirmer que la libération est majoritairement gouvernée par le phénomène de diffusion.

Les doses journalières d'antibiotique libéré sont de l'ordre de 1 à 2 mg/L dans le cas du ciment chargé avec 9 % de fusidate et de 0,5 à 1 mg/L et 0,3 à 0,8 mg/L respectivement dans le cas des ciments chargés avec 3% de fusidate ou d'acide fusidique. Ces doses sont suffisantes pour inhiber pratiquement toutes les souches de staphylocoques ainsi que les SARM. Cependant les résultats préliminaires de l'activité antibactérienne des ciments chargés avec 3 % d'acide fusidique et 3 et 9 % de fusidate de sodium sur des souches *S. aureus* montrent une faible activité anti-biofilm et ce quel que soit l'antibiotique utilisé ainsi que sa dose.

Notre travail de recherche consistait à concevoir des ciments à base de phosphate et carbonate de calcium, associant des agents thérapeutiques, et à utiliser ces matériaux comme support pour la libération locale et prolongée de substances actives (antibiotique). Si ce travail ouvre encore la voie à une recherche plus fondamentale pour approfondir les mécanismes de prise, de durcissement, d'association et de libération de principes actifs, des études biologiques sont encore nécessaires pour examiner le comportement in vitro du système formulé vis-à-vis du milieu environnant (étude de bioactivité en présence de diverses souches de bactéries). En outre, ce type de matériau occupe sur le plan médical une place importante pour le comblement des pertes de substances osseuses; l'étude de libération menée avec les ciments chargés en antibiotique sont encourageants et incitent à tester le substitut osseux injectable à visée thérapeutique en vue d'évaluer in vivo l'effet du traitement de l'infection osseuse par antibiothérapie locale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- khraisat M.H., Rueda C., Cabrejos-Azama J., Lucas-Aparicio J., Mariño F.T., Torres García-Denche J., Blanco Jerez L., Gbureck U., Lopez Cabarcos E., Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement, *Acta Biomater.*, 6 (2010), pp. 1522–1528.
- Andersen F.A., Bracevic L., Infrared spectra of amorphous and crystalline CaCO₃, *Acta Chem. Scand.*, 45 (1991), pp. 1018-1024.
- Antony J.W., Bidaux R.A., Bladh K.W., Nichols M.C., *Handbook of Mineralogy*, Mineralogical Society of America (2005).
- Aoki H., *Medical applications of hydroxyapatite*, Ishiyaku EuroAmerica, Inc., Tokyo (1994).
- Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger, Bohner M., Matter S., Auer J.A., Von Rechenberg B., In Vivo behaviour of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements, *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 1439-51.
- Atkins B., Gottlieb T., Fusidic acid in bone and joint infections, *Int J Antmicrob Ag.*, 12(Suppl.2) (1999), pp. S79-S93.
- Autefage H., Rôle osteoinducteur d'un revêtement d'apatite carbonatée nanocristalline sur des céramiques de phosphates de calcium biphasique, Thèse, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier 2009.
- Baker A.S., Greenham L.W., Release of gentamicin from acrylic bone cement, *J Bone joint Surg Am.*, 70 (1988), pp. 1551.
- Baradari H., Damia C., Dutreih-Colas M., Laborde E., Calcium phosphate porous pellets as drug delivery systems: Effect of drug carrier composition on drug loading and in vitro release, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 32 (2012) 2679–2690.
- Barroug A., Glimcher M.J., Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin : adsorption and release of cisplatin in vitro, *J. Orthop. Res.*, 20(2) (2002), pp. 274-280.
- Barroug A., Kuhn L.T., Gerstenfeld L.C., Glimcher M.J., Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release, *J. Orthop. Res.*, 22(4) (2004), pp. 703-708.
- Barroug A., Legrouri A., Rey C., Exchange Reactions at Calcium Phosphates Surface and Applications to Biomaterials, *Key Eng. Mater.*, 361-363 (2008), pp. 79-82.
- Barroug A., Lemaitre J., Rouxhet P.G., Lysozyme on apatites: A model of protein adsorption controlled by electrostatic interactions, *Colloids Surf.*, 37 (1989), pp. 339-355.
- Barroug A., Lernoux E., Lemaitre J., Rouxhet P.G., Adsorption of catalase on hydroxyapatite, *J. Colloid Interface Sci.*, 208(1) (1998), pp.147-152.
- Bazin D., Daudon M., Combes C., Rey C., Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications, *Chem. Rev.*, 112 (2012), pp. 5092–5120.
- Benaziz L., Barroug A., Legrouri A., Rey C., Lebugle A., Adsorption of O-phospho-L-serine and L-serine onto poorly crystalline apatite, *J. Colloid Interface Sci.*, 238(1) (2001), pp. 48-53.
- Benaziz L., Réactivité de phosphates de calcium vis-à-vis d'acides aminés et conséquences biologiques, Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Marrakech (2002).
- Bennani M., Système phosphate de calcium-carbonate de calcium en milieu eau-éthanol: Synthèse, caractérisation et réactivité, Thèse d'Etat, Université Ibn Tofail, Kénitra (1998).
- Bigi A., Bracci B., Panzavolta S., Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement, *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 2893–2899.

- Bodley J.W., Zieve F.J., Lin L., Studies on translocation. IV. The hydrolysis of a single round of guanosine triphosphate in the presence of fusidic acid. *J Biol Chem.*, 245(21) (1970), pp. 5662-5667.
- Bohner M., Le maître J., Van landuy T.P., et al., Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery System. *J. Pharm. Sci.*, 86 (1997), pp. 565-72.
- Bohner M., Baroud G., Injectability of calcium phosphate pastes, *Biomaterials*, 26 (2005-a), pp. 1553-1563.
- Bohner M., Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury*, 31(Suppl 4) (2000), pp. 37–47.
- Bonher M., Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *European Cells & Materials* 20 (2010), pp. 1–12.
- Boskey A., Maresca M., Appel J., The effects of non collagenous matrix proteins on hydroxyapatite formation and proliferation in a collagen gel system, *Connect Tissue Res.*, 21(1-4) (1989), pp. 171-178.
- Bouillet R., Bouillet B., Kadima N., Gillard J., Treatment of chronic osteomyelitis in Africa with plaster implants impregnated with antibiotics, *Acta Orthop Belg.*, 55 (1989), pp. 1 – 11.
- Brito M., Case E., Kriven W.M., Salem J., Zhu D., Tas A.C., Use of vaterite and calcite in forming calcium phosphate cement scaffolds, *Ceram. Eng. Sci. Proc.*, 28 (9) (2009), pp. 135–150.
- Brouard S., Lelan J., Lancien G., Thomazeau H., Langlais F., Phosphate tricalcique, vecteur d'antibiotique : gentamicine et vancomycine. Caractérisation physicochimique in vitro, étude de la porosité du biomatériau et du relargage de la gentamicine et de la vancomycine, *Chirurg.*, 122 (1997), pp. 397–403.
- Brown W.E., Chow L.C., A new calcium phosphate setting cement, *J. Dent. Res.*, 62 (1983), pp. 672.
- Buchholz H., Elson R., Heinert K., Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 190 (1984), pp. 96-108.
- Buchholz H.W., Engelbrecht H., Über die depotwirkung einiger antibiotica bei vermischung mit dem kunstharz Palacos, *Chirurg.*, 41 (1970), pp. 511-515.
- Campoccia D., Montanaro L., Arciola C.R., The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials*, 27 (2006), pp. 2331 - 2339.
- Canal C., Ginebra M.P., Fibre-reinforced calcium phosphate cements: a review, *J. Mech. Behav. Biomed.*, 4 (2011), pp. 1658–1671.
- Canal C., Pastorino D., Mestres G., Schuler P., Ginebra M.P., Relevance of microstructure for the early antibiotic release of fresh and pre-set calcium phosphate cements, *Acta Biomaterialia*, Volume 9, Issue 9, September 2013, Pages 8403-8412.
- Carey M.C., Small D.M., Micellar properties of sodium fusidate, a steroid antibiotic structurally resembling the bile salts, *J Lipid Res.*, 12(5) (1971), pp. 604-613.
- Carter D.R., Hayes W.C., The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure, *J. of Bone Joint Surgery*, 59A (1977), pp. 954-962.
- Cazalbou S., Bertrand G., Drouet C., Tetracycline-Loaded Biomimetic Apatite: An Adsorption Study. *J. Phys. Chem.* 2015 (sous presse).

- Cazalbou S., Combes C., Eichert D., Rey C., Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates, *J. Mater. Chem.*, 14(14) (2004a), pp. 2148-2153.
- Cazalbou S., Combes C., Eichert D., Rey C., Glimcher M.J., "Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo", *J. Bone Miner. Metab.*, 22(4) (2004b), pp. 310-317.
- Cazalbou S., Echanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux, INP, Toulouse, (2000).
- Charnley J., The Bonding of Prostheses to Bone by Cement, *J Bone Joint Surg Br.*, 46 (1964), pp. 518-529.
- Chen J., Xiang L., Controllable synthesis of calcium carbonate polymorphs at different temperatures, *Powder Technol.*, 189 (2009), pp. 64–69.
- Christiansen K., Fusidic acid adverse drug reactions. *Int J Antmicrob Ag.*, 12(Suppl 2) (1999), pp. S3 -S9.
- Coello A., Meijide F., Rodriguez Nunez E., Vazquez Tato J., Aggregation behavior of sodium fusidate in aqueous solution, *J Pharm Sci.*, 83(6) (1994), pp. 828-832.
- Collignon P., Turnidge J., Fusidic acid in vitro activity, *Int J Antmicrob Ag.*, 12 (Supplement 2) (1999), pp. S45-S58.
- Combes C., Bareille R., Miao B., Rey C., Preparation, physical-chemical characterization and cytocompatibility of calcium carbonate cements. *Biomaterials*, 27(9) (2006b), pp. 1945–54.
- Combes C., Bareille R., Rey C., Calcium carbonate-calcium phosphate mixed cement compositions for bone reconstruction, *J Biomed Mater Res A*, 79 (2) (2006a), pp. 318–328.
- Combes C., Rey C., Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity, *Biomaterials*, 23(13) (2002), pp. 2817-2823.
- Constantz B.R., Ison I.C., Fulmer M.T., Poser R.D., Smith S.T., Van Wagoner M., Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone, *Science*, 267 (1995), pp. 1796–1799.
- Coombs R.R., Fusidic acid in staphylococcal bone and joint infection, *J Antimicrob Chemother.*, 25 (Suppl B) (1990), pp. 53-60.
- Costa P., Jose M.S.L., Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur J Pharma Sci.*, 13 (2001), pp. 123–133.
- Cui Z.G., Cui C.F., Zhu Y., Binks B.P., Multiple phase inversion of emulsions stabilized by in situ surface activation of CaCO₃nanoparticles via adsorption of fatty acids, *Langmuir*, 28 (1) (2012), pp. 314–320.
- Daculsi G., Passuti N., Martin S., Le Nihouannen J.C., Brulliard V., Delecrin J., Comparative study of bioactive calcium phosphate ceramics after implantation in spongy bone in dogs. Histologic, ultrastructural and electron probe microanalysis, *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.*, 75 (2) (1989), pp. 65-71.
- Daculsi G., LeGeros R.Z., Heughebaert M., Barbieux I., Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics, *Calcif Tissue Int.*, 46 (1990), pp. 20–27.
- Darley E.S.R., MacGowan A.P., Antibiotic treatment of Gram-positive bone and joint infections, *J. Antimicrob. Chemother.*, 53 (6) (2004), pp. 928-935.
- De Vernejoul M.C, Cellules osseuses et remodelage osseux, *médecine/sciences*, 9 (1 993), pp. 1192-1203.

- Delecrin J Prosp., Takahashi S., A synthetic Ceramic as a Bone Graft Substitute in the Surgical Management of Scoliosis. A active, Randomised Study, *Spine*, 25 (5) (2000), pp. 563 – 569.
- Demichelis R., Raiteri P., Gale J.D., Dovesi R., A new structural model for disorder in vaterite from first-principles calculations, *Cryst. Eng. Comm.*, 14 (2012), pp. 44–47.
- Dennis D.A, Little L.R, The structural allograft composite in revision total knee arthroplasty, *Orthopedics*, 28 (9) (2005), pp. 1005-1007.
- Diefenbeck M., Muckley T., Hofmann G.O., Prophylaxis and treatment of implant related infections by local application of antibiotics, *Injury*, 37 (Supp 12) (2006), pp. S95-S104.
- Dombrowski J.C., Winston L.G., Clinical failures of appropriately-treated methicillin-resistant staphylococcus aureus infections, *J Infect.*, 57 (2008), pp. 110-115.
- Dorozhkin S.V., Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, *Materials*, 2 (2009), pp. 399-498.
- Dorozhkin S.V., Epple M., Biological and medical significance of calcium phosphates, *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 41(17) (2002), pp. 3130-3146.
- Driessens F. C. M., Boltong M. G., Bermudez O., Planell J. A., Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 4(5) (1993), pp. 503-508.
- Driessens F.C.M., Boltong M.G., De Maeyer E.A.P., Verbeeck R.M.H., Effect of temperature and immersion on the setting of calcium phosphate cements, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 11 (7) (2000), pp. 453–457.
- Dunne N.J., O’Hara R., Buchanan F., Orr J., Effect of Liquid/Powder Ratio on the Setting, Handling and Mechanical Properties of Collagen–Apatitic Cements, *Key Eng Mat.*, (493-494) 2011, pp. 415-421.
- Eichert D., Drouet C., Sfihi H., Rey C., Combes C., Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization, In : *Biomaterials Research Advances*. JB Kendall, (2007), pp. 93–143.
- Eichert D., Sfihi H., Banu, M., Cazalbou, S., Combes, C., Rey, C., Surface structure of nanocrystalline apatites for bioceramics and coating, *Proceeding of CIMTEC, Materials in clinical applications, Faenza, Italie*, (2002).
- El Rhilassi A., Mourabet M., El Boujaady H., Bennani-Ziatni M., El Hamri R., Taitai A., Adsorption and release of amino acids mixture onto apatitic calcium phosphates analogous to bone mineral. *Applied Surface Science* 259 (2012), pp. 376 – 384
- Elliott J.C., *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam (1994).
- Errassifi F., Menbaoui A., Autefage H., Benaziz L., Ouizat S., Santran V., Sarda S., Lebugle A., Combes C., Barroug A., Sfihi H., Rey C., Adsorption on apatitic calcium phosphates: Applications to drug delivery, in *Advances in Bioceramics and biotechnologies*, *Ceram Trans.*, 218 (2010), pp. 159-174.
- Errassifi F., Sarda S., Barroug A., Legrouri A., Sfihi H., Rey C., Infrared, Raman and NMR investigations of risedronate adsorption on nanocrystalline apatites. *J Colloid Interface Sci.*, 420 (15) (2014), pp. 101-111.
- Errassifi, F., Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques : Applications aux biomatériaux, Thèse, Université Cadi Ayyad Marrakech, (2011).

- Falagas M.E., Grammatikos A.P., Michalopoulos A., Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics, *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 6 (5) (2008), pp. 593-600.
- Fiore S., Laviano R., Brushite, hydroxyapatite, and taranakite from Apulian caves (southern Italy): New mineralogical data, *Am. Mineral.*, 76 (1991), pp. 1722–1727.
- Fontaine M., Combes C., Mounic S., Rey C., Composition de ciment hydraulique à base de carbonates de calcium, Brevet FR2830249, (2001).
- Friedman C.D., Costantino P.D., Takagi S., Chow L.C., BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction, *J. Biomed. Mater. Res.*, 43 (1998), pp. 428–432.
- Fujiwara M., Shiokawa K., Araki M., Ashitaka N., Morigaki K., Kubota T., Nakahara Y., Encapsulation of Proteins into CaCO₃ by Phase Transition from Vaterite to Calcite, *Cryst. Growth Des.*, 10 (9) (2010), pp. 4030–4037.
- Garvin K.L., Hinrichs S.H., Urban J.A., Emerging antibiotic-resistant bacteria. Their treatment in total joint arthroplasty, *Clin Orthop Relat Res.*, 3 (69) (1999), pp. 110-123.
- Ghosh S.K., Nandi S.K., Kundu B., Datta S., De D.K., Roy S.K., Basu D., In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 86 (2008), pp. 217–227.
- Ginebra M.P., ‘Calcium phosphate bone cements’, In: Deb S. *Orthopaedic Bone Cements*, Woodhead Publishing Limited, England, (2008), pp. 206–230.
- Ginebra M.P., Canal C., Espanol M., Pastorino D., Montufar E.B., Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Adv Drug Deliv Rev*, 64 (2012), pp. 1090–1110.
- Ginebra M.P., Rilliard A., Fernández E., Elvira C., San Román J., Planell J.A., Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug, *J. Biomed. Mater. Res.*, 57 (2001), pp. 113–118.
- Giudicelli J., Souberbielle J.C., Le remodelage osseux et l’exploration de l’ostéoporose, *Revue de l’ACOMEN*, 4(3) (1998), pp. 251-272.
- Glimcher M.J., Bonar L.C., Grynblas M.D., Landis W.J., Roufosse A.H., Recent studies of bone mineral : is the amorphous calcium phosphate theory ?, *J. Crystal Growth.*, 53 (1981), pp. 100-119.
- Glimcher M.J., Muir H., Recent studies of the mineral phase in bone and its possible Linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.*, 304(1121) (1984), pp. 479-508.
- Godtfredsen W.O., Jahnsen S., Lorck H., Roholt K, Tybring L. Fusidic acid; a new antibiotic. *Nature (London, United Kingdom)*, 193 (1962), pp. 987.
- Goodson J.M., Offenbacher S., Farr D.H., Hogan P.E., Periodontal disease treatment by local drug delivery, *J. Periodontol.*, 56 (5) (1985), pp. 265-272.
- Gorbunoff M.J., The interaction of proteins with hydroxyapatite: Role of protein charge and structure, *Anal. Biochem.*, 136 (2) (1984), pp. 425-432.
- Gould I.M., MRSA bacteraemia, *Int J Antimicrob Ag.*, 30 (Suppl 1) (2007), pp. 66-70.
- Graham N.M, Stockley I., The use of structural proximal femoral allografts in Complex revision hip arthroplasty, *J Bone Joint Surg Br.*, 86 (2004), pp. 337-343.

- Habib M., Baroud G., Gitzhofer F., Bohner M., Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste. Part II: particle separation study, *Acta Biomater.*, 6 (1) (2010), pp. 250–256.
- Hak D.J., The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma, *J Am Acad Orthop Surg.*, 15 (2007), pp. 525–536.
- Han Y.S., Hadiko G., Fuji M., Takahashi M., Effect of flow rate and CO₂ content on the phase and morphology of CaCO₃ prepared by bubbling method, *J. Cryst. Growth*, 276 (3-4) (2005), pp. 541–548.
- Hasegawa M., Sudo A., Komlev V.S., Barinov S.M., Uchida A., High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution, *Appl Biomater.*, 70 (2004), pp. 332–339.
- Hassan M., Amer S.M., Amer M.M., Determination of fusidic acid and sodium fusidate in pharmaceutical dosage forms by first-derivative ultraviolet spectrophotometry. *Analyst.*, 12 (1987), pp. 1459-1461.
- Hesaraki S., Nemati R., Cephalexin-loaded injectable macroporous calcium phosphate bone cement, *J. Biomed. Mater. Res.*, 89 B (2009), pp. 342–352.
- Hesaraki S., Nemati R., Nosoudi N., Preparation and characterisation of porous calcium phosphate bone cement as antibiotic carrier, *Adv. Appl. Ceram.*, 108 (2009), pp. 231–240.
- Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.* 52 (1963), pp. 1145–1149.
- Hoff S.F., Fitzgerald R.H., Kelly P.J., The depot administration of penicillin G and gentamicin in acrylic bone cement, *J Bone Joint Surg Am.*, 63 (1981), pp. 798–804.
- Hofmann M.P., Mohammed A.R., Perrie Y., Gbureck U., Barralet J.E., High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities, *Acta Biomater.*, 5 (2009), pp. 43–49.
- Huang S.-C., Naka K., Chujo Y., Effect of molecular weights of poly(acrylic acid) on crystallization of calcium carbonate by the delayed addition method, *Polym. J.*, 40 (2) (2008), pp. 154–162.
- Iafisco M. & Delgado-Lopez J.M. (editors), *Apatite: Synthesis, Structural Characterisation and Biomedical Application*, Nova Science Publishers Inc, New York, 2014.
- INVS., *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales*. Institut de Veille Sanitaire, (2007).
- Itokazu M., Matsunaga T., Kumazawa S., Wenyi Y., A novel drug delivery system for osteomyelitis using porous hydroxyapatite blocks loaded by centrifugation, *J Appl Biomater.*, 6 (1995), pp. 167–169.
- Joosten U., Joist A., Frebel T., Brandt B., Diederichs S., von Eiff C., Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo, *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 4287–4295.
- Kafilak A., Kolodzejski W., Complementary information on water and hydroxyl groups in nanocrystalline carbonated hydroxyapatites from TGA, NMR and IR measurements, *J. Mol. Struct.*, 990 (1-3) (2011), pp. 263–270.
- Kallmes D.F., Jensen M.E., Percutaneous vertebroplasty, *Radiology*; 229(1) (2003), pp. 27-36.

- Kandori K., Sawai S., Yamamoto Y., Saito H., Ishikawa T., Adsorption of albumin on calcium hydroxylapatite, *Colloids Surf.*, 68 (4) (1992), pp. 283-289.
- Kanellakopoulou K., Giamarellos-Bourboulis E.J., Carrier systems for the local Delivery of antibiotics in bone infections, *Drugs*, 59 (6) (2000), pp. 1223-1232.
- Karlov A V., Khlusov I. A., Pontak V. A, Ignatov V.P., Ivin M. A., Zinatulina S.Y., Adhesion of staphylococcus aureus to implants with different physicochemical characteristics. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 134 (3) (2002), pp. 277–80.
- Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A., Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement, *Biomaterials*, (18)(23) (1997), pp. 1535-1539.
- Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A., Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 9(1998), 425–428.
- Khalilzadeh P., Lajoie B., El Hage S., Furiga A., Ve Baziard G., Berge M., Roques C., Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by an N-butanoyl-L-homoserine lactone analog. *Can J Microbiol.*, 56 (4) (2010), pp. 317–25.
- Kisanuki O., Yajima H., Umeda T., Takakura Y., Experimental study of calcium phosphate cement impregnated with dideoxy-kanamycin B, *J. Orthop. Sci.*, 12 (2007), pp. 281–288.
- Kopcha M, Lordi N, Tojo KJ. Evaluation of release from selected thermosoftening vehicles. *J Pharm Pharmacol*, 43(1991), pp. 382–387.
- Korkusuz F., Ushida A., Shinto Y., Araki N., Inoue K., Ono K., Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites, *J. bone jt Surg.*, 75-B (1) (1993), pp. 111-114.
- Korsmeyer R.W, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm*, 15 (1983), pp. 25–35.
- Kuhn L. T., Grynepas M. D., Rey C. C., Wu Y., Ackerman J. L. and Glimcher M. J., A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages, *Calcif Tissue Int.*, 83 (2) (2008), pp. 146-154.
- Lambotte J.C., Thomazeau H., Cathelineau G., Lancien G., Minet J., Langlais F., Phosphate tricalcique vecteur d'antibiotique: étude sur foyer d'ostéomyélite expérimentale chez le lapin, *Chirurgie.*, 123 (1998), pp. 572-579.
- Lamoureux F., Baud'huin M., Duplomb L., Heymann D., and Redini F., Proteoglycans: key partners in bone cell biology, *Bioassays*, 29 (8) (2007), pp. 758-771.
- Lazarettos J., Efstathopoulos N., Papagelopoulos P.J., Savvidou O.D., Kanellakopoulou K., Giamarellou H., Giamarellos-Bourboulis E.J., Nikolao V., Kapranou A., Papalois A., Papachristou G. A., bioresorbable calcium phosphate delivery system with teicoplanin for treating MRSA osteomyelitis, *Clin Orthop.*, 423 (2004), pp. 253–258.
- Le Huec J.C., Schaefferbeke T., Clement D., Pehourcq F., Bannwarth B., Desperiez M., Dehais J., etude in vitro de la libération de rifamycine à partir d'une matrice phosphate de calcium amorphe, *Actualités en biomatériaux IV*, (1997), pp. 189-196.
- Lebugle A., Rodrigues A., Bonneville P., Voigt J.J., Canal P., Rodriguez F., Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate, *Biomaterials*, 23(16) (2002), pp. 3517-3522.

- Legeros R., Balmain N., And Bonep G., Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone, *Calcif. Tissue Int.*, 41(1987), pp. 137–144.
- LeGeros R.Z., Bonel G., Legros R., Types of “H₂O” in human enamel and in precipitated apatites, *Calcif. Tissue Inter.*, 26 (1) (1978), pp. 111-118.
- LeGeros R.Z., Chohayeb A., Shulman A., Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials, *J. Dent. Res.*, 61 (1982), p. 343.
- Lepretre S., Chai F., Hornez J.C., Vermet G., Neut C., Descamps M., Hildebrand H.F., Martel B., Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers, *Biomaterials.*, 30 (2009), pp. 6086–6093.
- Li Q., Ding Y., Li F., Xie B., Qian Y., Solvothermal growth of vaterite in the presence of ethylene glycol, 1,2-propandiol and glycerine, *J. Cryst. Growth.*, 236 (2002), pp. 357–362.
- Libouban H., Remodelage osseux, In: *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, M. C. Vernejoul et P. Marie, Chap. 1 (2008), pp. 3-8.
- Lieberman I.H., Togawa D., Kayanja M.M., Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials, *Spine J.*, 5(6 Suppl) (2005), pp. 305S-16S.
- Linde A., Lussi A., Crenshaw M.A., Mineral induction by immobilized polyanionic proteins, *Calcif. Tissue Int.*, 44(4) (1989), pp. 286-295.
- Liu W., Chang J., In vitro evaluation of gentamicin release from a bioactive tricalcium silicate bone cement, *Mater. Sci. Eng. C.*, 29 (2009), pp. 2486–2492.
- Ma M.G., Zhu J.F., Recent progress on fabrication of calcium-based inorganic biodegradable nanomaterials, *Recent Pat. Nanotechnol.*, 4 (2010), pp. 164–170.
- Masri B.A., Duncan C.P., Beauchamp C.P., Arntorp J., The effect of varying surface patterns on antibiotic elution from antibiotic loaded bone cement, *J Arthroplasty.*, 10 (1995), pp. 453-459.
- McConnell J.D.C., Vaterite from Ballycraigy, Larne, Northern Ireland, *Mineral. Mag.*, 32 (250) (1960), pp. 534–544.
- McNally M.A., Small J.O., Tofighi H.G., Mollan R.A., Two-stage management of chronic osteomyelitis of the long bones. The Belfast technique, *J. Bone Joint Surg. Br.*, 75 (1993), pp. 375–380.
- Melo H., Brandao C., Rego G., Nunes R., Ethical and legal issues in xenotransplantation, *Bioethics*, 15 (2001), pp. 427-442.
- Mestres G., Ginebra M.P., Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties, *Acta Biomater.*, 7 (4) (2011), pp. 1853–1861.
- Migaud H., Senneville E., Comment traiter une infection ostéoarticulaire ?, *DUACAI*, (2008).
- Mirtchi A.A., Lemaître J., Terao N., Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate– monocalcium phosphate system, *Biomaterials.*, 10 (7) (1989), pp. 475-480.
- Misra D.N., Adsorption and orientation of tetracycline on hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Int.*, 48(5) (1991b), 362-367.
- Misra D.N., Adsorption of low molecular weight poly (acrylic acid) on hydroxyapatite: role of molecular association and apatite dissolution, *Langmuir*, 7(11) (1991a), 2422-2424.
- Misra D.N., Interaction of ortho-Phospho-l-serine with Hydroxyapatite: Formation of a Surface Complex, *J Colloid Interface Sci.*, 194(1) (1997), pp. 249-255.

- Moore G.E., on brushite, a new mineral in phosphatic guano, *Am. j. sci. Arts.*, 39(1865), pp. 43–44.
- Moreno E.C., Kresak M., Hay D.I., Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Int.*, 36(1) (1984), pp. 48-59.
- Murase K., Hirose H., Mori Y., Takagi H., Iwata H., Sago T., Kawamura Y., Graft-preserving treatment for vascular graft infected with *Staphylococcus aureus* with antibiotic-releasing porous apatite ceramic in the rabbit, *J Vasc Surg.*, 38 (2003), pp. 368–373.
- Nakamura J., Poologasundarampillai G., Jones J.R., Kasuga T., Tracking the formation of vaterite particles containing aminopropyl-functionalized silsesquioxane and their structure for bone regenerative medicine, *J. Mater. Chem. B*, 1 (2013), pp. 4446–4454.
- Nancollas G.H., Tang R., Phipps R.J., Henneman Z., Gulde S., Wu W., Mangood A., Russell R.G., Ebetino F.H., Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite, *Bone*, 38(5) (2006), pp. 617-627.
- Nandi S.K., Ghosh S.K., Kundu B., De D.K., Basu D., Evaluation of new porous beta-tricalcium phosphate ceramic as bone substitute in goat model, *Small Rumin Res.*, 75 (2008), pp. 144–153.
- Nandi S.K., Kundu B., Ghosh S.K., De D.K., Basu D., Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat, *J Vet Sci.*, 9 (2008), pp. 183–191.
- Nehrke G., van Cappellen P., van der Weijden C.H., Framboidal vaterite aggregates and their transformation into calcite: A morphological study, *J. Cryst. Growth*, 287 (2006), pp. 528–530.
- Neut D., Hendriks J.G., van Horn J.R., Kowaiski R.S., van der Mei H.C., Busscher H.J., Antimicrobial efficacy of gentamicin-loaded acrylic bone cements with fusidic acid or clindamycin added, *J Orthop Res.*, 24 (2) (2006), pp. 291-299.
- Niyibizi C. and Eyre D. R., Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen, *Eur J Biochem.*, 224 (3) (1994), pp. 943-950.
- Noshi T., Yoshikawa T., Ikeuchi M., Dohi Y., Ohgushi H., Horiuchi K., Sugimura M., Ichijima K., Yonemasu K., Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein, *J Biomed Mater Res.*, 52 (2000), pp. 621–630.
- O’Hara R., Buchanan F., Dunne N., Injectable calcium phosphate cements for spinal bone repair, *Biomaterials for Bone Regeneration Novel Techniques and Applications*, (2014), pp. 26–61.
- O’Hara T., Dunne A., Butler J., Devane J., A review of methods used to compare dissolution profile data, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(5)(1998), pp. 214-223.
- Oguachuba H.N., Use of instillation-suction technique in treatment of chronic osteomyelitis, *Acta Orthop Scand.*, 54 (1983), pp. 452-458.
- Ohgushi H., Okumura M., Yoshikawa T., Inboue K., Senpuku N., Tamai S., Shors E.C., Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.*, 26 (7) (1992), pp. 885–895.

- Oonishi H., Iwaki Y., Kin N., Kushitani S., Murata N., Wakitani S., Imoto K., Hydroxyapatite in revision of total hip replacements with massive acetabular defects: 4 to 10 year clinical results, *J Bone Joint Surg Br.*, 79 (1997), pp. 87-92.
- Orcel P., La fracture vertébrale ostéoporotique : fréquence, conséquences médicales et économiques, approche thérapeutique, *Actualités en vertébroplastie et en cyphoplastie*, 2009 (Paris).
- Ostermann P.A., Seligson D., Henry S.L., Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases, *J. Bone Joint Surg. Br.*, 77 (1995), pp. 93–97.
- Ouizat S., Apatites d'intérêt biologique: Elaboration, traitement, maturation et adsorption, Thèse, Université Cadi Ayyad, Marrakech (2000).
- Ouizat S., Barroug A., Legrouri A., Rey C., Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation, *Mater. Res. Bull.*, 34(14-15) (1999), 2279-2289.
- Pascaud P., Apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles de la réactivité osseuse : Etude des propriétés d'adsorption et de l'activité cellulaire d'un bisphosphonate, le tiludronate, Thèse, Université de Toulouse (2012).
- Pascaud P., Errassifi F., Brouillet F., Sarda S., Barroug A., Legrouri A., Rey C., Adsorption on apatitic calcium phosphates for drug delivery: interaction with bisphosphonate molecules. *J Mater Sci: Mater Med.*, 25 (10) (2014), pp. 2373-2381.
- Passuti N., Gouin F., Antibiotic-loaded bone cement in orthopedic surgery, *Joint Bone Spine*, 70 (3) (2003), pp. 169-174.
- Penner M.J., Masri B.A., Duncun C.P., Elutions characteristics of vancomycin and tobramycine combined in acrylic bone cements, *J Arthroplasty.*, 11 (1996), pp. 939-944.
- Peppas N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 60 (1985), pp. 110–111.
- Perry C.R., Davenport K., Vossen M.K., Local delivery of antibiotics via an implantable pump in the treatment of osteomyelitis, *Clin Orthop Relat Res.*, 226 (1988), pp. 222 -230.
- Petrov I., Šoptrajanov B., Fuson N., Lawson J.R., Infra-red investigation of dicalcium phosphates, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectros.*, 23(10) (1967), pp. 2637–2646.
- Pratt J.N., Griffon D.J., Dunlop D.G., Smith N., Howie C.R., Impaction grafting with morsellised allograft and tricalcium phosphate-hydroxyapatite: incorporation within ovine metaphyseal bone defects, *Biomaterials.*, 23(16) (2002), pp. 3309-3317.
- Qiu N., Yin H., Ji B., Klauke N., Glidle A., Zhang Y., Song H., Cai L., Ma L., Wang G., Chen L., Wang W., Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin, *Mater. Sci. Eng. C*, 32 (2012), pp. 2634–2640.
- Quinlan W., Mehigan C., The release of antibiotics from bone cement, *Jr J Med Sci*, 147 (12) (1978), pp. 425-429.
- Ransford A.O., Morley T., Edgar M. A., Webb P., Passuti N., Chopin D., Morin C., Michel F., Garin C., Pries D., Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. A prospective, randomised study of 341 patients, *J Bone Joint Surg Am.*, 80 (1) (1998), pp. 13-18.
- Ratier A., Best S., Freche M., Lacout J., Rodriguez F., Behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline hydrochloride or tetracycline complexed with calcium ions, *Biomaterials*, 22 (2001), pp. 897–901.

- Ratier A., Freche M., Lacout J.L., Rodriguez F., Behaviour of an injectable calcium phosphate cement with added tetracycline, *Int. J. Pharm.*, 274 (2004), pp. 261–268.
- Ratier A., Gibson I., Best S., Freche M., Lacout J., Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline, *Biomaterials*, 22 (2001), pp. 897–901.
- Ray L. Frost, Sara J. Palmer., Thermal stability of the ‘cave’ mineral brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Mechanism of formation and decomposition, *Thermochim Acta.*, 521 (2011), pp. 14–17.
- Regner L., Carlsson L., Kärrholm J., Herberts P., Ceramic coating tibial component fixation in total knee arthroplasty, *J Arthroplasty.*, 13 (1998), pp. 882-889.
- Rey C., Lian J., Grynblas M., Shapiro F., Zylberberg L., Glimcher M.J., Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states, *Connective Tissue Research*, 21(1) (1989), pp. 267-273.
- Rey, C. Combes C., Drouet C., Lebugle A., Sfihi H., Barroug A., Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties, *Materwiss Werksttech.*, 38 (12) (2007), pp. 996-1002.
- Rey C., Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties, *Biomaterials*, 11 (1990), 13-15.
- Rey C., Collins B., Goehl T., Dickson I.R., Glimcher M.J., The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study, *Calcif. Tissue Inter.*, 45(3) (1989b), pp. 157-164.
- Rey C., Combes C., Drouet C., Cazalbou, Grossin D., Brouillet F., Sarda S., Surface properties of biomimetic nanocrystalline apatites; applications in biomaterials. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, 60 (2014) , pp. 63-73.
- Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H., Barroug A., Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials, *Mater. Sci. Eng. C.*, 27(2) (2007b), pp. 198-205.
- Rey C., Hina A., Somrani S., Jemal M., Glimcher M.J., Chemical properties of poorly crystalline apatites, *Phosph. Res. Bull.*, 6 (1996), pp. 67-70.
- Rey C., Miquel J.L., Facchini L., Legrand A.P., Glimcher M.J., Hydroxyl groups in bone mineral, *Bone.*, 16 (5) (1995b), pp. 583-586.
- Rey C., Renugopalakrishnan V., Collins B., Glimcher M.J., Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging, *Calcif. Tissue Inter.*, 49(4) (1991b), pp. 251-258.
- Rey C., Shimizu M., Collins B., Glimcher M.J., Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2 Investigations in the $\nu_3\text{PO}_4$ domain, *Calcif. Tissue Inter.*, 49 (6) (1991a), pp. 383-388.
- Rice D.A.K., Mendez-Vigo L., Daptomycin in bone and joints infections: a review of the literature, *Arch Orthop Trauma Surg.*, 129 (2009), pp. 1495-1504.
- Rieger J., Frechen T., Cox G., Heckmann W., Schmidt C., Thieme J., Precursor structures in the crystallization/precipitation processes of CaCO_3 and control of particle formation by

polyelectrolytes, *The Royal Society of Chemistry; Faraday Discuss.*, 136 (2007), pp. 265–277.

- Rill C., Kolar Z.I., Kickelbick G., Wolterbeek H.T., Peters J.A., Kinetics and thermodynamics of adsorption on hydroxyapatite of the [160Tb]Terbium complexes of the bone-targeting ligands DOTP and BPPED, *Langmuir*, 25 (4) (2009), pp. 2294-2301.
- Rodriguez-Navarro C., Jimenez-Lopez C., Rodriguez-Navarro A., Teresa Gonzalez-Munoz M., Rodriguez-Gallego M., Bacterially mediated mineralization of vaterite, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 71 (2007), pp. 1197–1213.
- Ross N., Tacconi L., Miles J. B., Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting, *Br J Neurosurg.*, 14 (2000), pp. 476-479.
- Roufosse A.H., Landis W.J., Sabine W.K., Glimcher M.J., Identification of brushite in newly deposited bone mineral from embryonic chicks, *J. Ultrastruct. Res.*, 68 (1979), pp. 235-255.
- Sanden B., Olerud C., Petren-Mallmin M., Larsson S., Hydroxyapatite coating improves fixation of pedicle screws, *J Bone Joint Surg Br.*, 84 (2002), pp. 387-391.
- Sato M., Matsuda S., Structure of vaterite and infrared spectra, *Z. Krist.*, 129 (1969), pp. 405–410.
- Schmidmaier G., Herrmann S., Green J., Weber T., Scharfenberger A., Haas N. P., Wildemann B., Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation, *Bone*, 39 (5) (2006), pp. 1156-1163.
- Schreiweis M. A., Butler J. P., Kulkarni N. H., Knierman M. D., Higgs R. E., Halladay D. L., Onyia J. E., Hale J. E., A proteomic analysis of adult rat bone reveals the presence of cartilage/chondrocyte markers, *J Cell Biochem.*, 101 (2) (2007), pp. 466-476.
- Shigaku S., Katsuyuki F., Beta-tricalcium phosphate as a bone graft substitute, *Jikeikai Med J.*, 52 (2005), pp. 47–54.
- Shimabayashi S., Tanizawa Y., Ishida K., Effect of phosphorylated organic compound on the adsorption of bovine serum albumin by hydroxyapatite, *Chem. Pharm. Bull.*, 39 (9) (1991), pp. 2183-2188.
- Shinto Y., Uchida A., Korkusuz F., Araki N., Ono K., Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics, *J Bone Joint Surg Br.*, 74(4) (1992), pp. 600-604.
- Stallmann H.P., Faber C., Bronckers A.L.J.J., A.V., Nieuw Amerongen, Wuisman P.I.J.M., Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11- or gentamicin-containing calcium phosphate cement, *J. Antimicrob. Chemother.*, 54 (2004), pp. 472–476.
- Tadier S., Etude des propriétés physico-chimiques et biologiques de ciments biomédicaux à base de carbonate de calcium : apport du procédé de co-broyage, Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2009.
- Tamimi F., Torres J., Bettini R., Ruggera F., Rueda C., López-Ponce M., Lopez-Cabarcos E., Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 85 (2008), pp. 707–714.
- Tanaka N., Kinoshita T., Masukawa H., Mechanism of inhibition of protein synthesis by fusidic acid and related steroidal antibiotics, *J Biochem.*, 65 (3) (1969), pp. 459-464.
- Theiss F., Apelt D., Brand B., Kutter A., Zlinsky K., Böhner M., Matter S., Frei C., Auer J.A., Von Rechenberg B., Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement, *Biomaterials*, 26 (2005), pp. 4383–4394.

- Thomazeau H., Langlais F., Relargage d'antibiotiques par implantation osseuse de phosphate tricalcique. Pharmacocinétique in vitro et in vivo de formes galéniques différentes, *Chirurgie*, 121 (1996), pp. 663–666.
- Tonino A.J., Therin M., Doyle C., Hydroxyapatite coated femoral stems. Histology and histomorphometry around five components retrieved at post mortem, *J Bone Joint Surg Br.*, 81 (1999), pp. 148-154.
- Tortet L., Study of protonic mobility in CaHPO₄·2H₂O (Brushite) and CaHPO₄ (Monetite) by infrared spectroscopy and neutron scattering, *J. Solid State Chem.*, 132 (1) (1997), pp. 6–16.
- Tortora G. J., Principes d'anatomie et de physiologie, De Boeck, (2007).
- Trombe J.C., Contribution à l'étude de la décomposition et la réactivité de certaines apatites hydroxylées carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses, Thèse d'Etat, Université Paul Sabatier, Toulouse (1972).
- Trpkovska M., Šoptrajanov B., Malkov P., FTIR reinvestigation of the spectra of synthetic brushite and its partially deuterated analogues, *J. Mol. Struct.*, 480-481(1999), pp. 661–666.
- Tunger O., Arlsoy A., Kurutepe S., Akcall S., Ozbakkaloglu B., In vitro susceptibility of Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcus strains to fusidic acid, *Int J Antmicrob Ag.*, 18 (5) (2001), pp. 445-447.
- Turnidge J., Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Int J Antmicrob Ag.*, 12(Supplement 2) (1999), pp. S23-S34.
- Uchida A, Shinto Y, Araki N, Ono K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J. Orthop. Res.* 1992;10: 440–5.
- Van de Belt H., Neut D., Uges D.R., Schenk W., Van Horn J.R., Van der Mei H.C, Busscher H.J., Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release, *Biomaterials*, 21 (2000), pp. 1981-1987.
- Varlet A., Dauchy P., Hingrez M., Osteogenesis induced by the addition of demineralized bone matrix to plaster pellets with antibiotics. Animal experiment, *Rev Chir Orthop*, 71 (1985), pp. 73–78.
- Viguet-Carrin S., Garnero P. Delmas P.D., The role of collagen in bone strength, *Osteoporosis Int.*, 17 (3) (2006), pp. 319-336.
- Wang X., Wu C., Tao K., Zhao K., Wang J., Xu H., Xia D., Shan H., Lu J.R., Influence of Ovalbumin on CaCO₃ Precipitation during in Vitro Biomineralization, *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010), pp. 5301–5308.
- Whitby M., Fusidic acid in the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Int J Antmicrob Ag.*, 12(Suppl2) (1999), pp. S67-S71.
- Woodard J.R., Hilldore A.J., Lan S.K., Park S.K., Parl C.J., Morgan A.W., Eurell J.A.C., Clark S.G., Wheeler M.B., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J., The mechanical properties and osetoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity, *Biomaterials*, 28(1) (2007), pp. 45–54.
- Wright J.A., Nair S.P., Interaction of staphylococci with bone, Mini-Review. *Int J Med Microbiol.*, (2009), doi: 10.1016/j.ijmm.2009.10.003.
- Yamamoto Y., Onga T., Marui T., Mizuno K., Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumours, *J Bone Joint Surg Br.*, 82 (2000), pp. 1117-1120.

- Yamashita Y., Uchida A., Yamakawa T., Shinto Y., Araki N., Kato K., Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic, *Orthop Int.*, 22 (1998), pp. 247-251.
- Yao C.L., Xu W.H., Ding A.M., Zhu J.M., Sucrose/bovine serum albumin mediated biomimetic crystallization of calcium carbonate, *J. Chem. Sci.*, 121 (1) (2009), pp. 89–93.
- Zayane S., Evaluation des granules du phosphate dicalcique dihydraté- phosphate tricalcique- β , chargés de gentamicine, dans le traitement local de l'ostéite expérimentale à *Staphylococcus aureus*, Thèse, Université François Rabelais, Tours (2010).
- Zhao Y., Du W., Sun L., Yu L., Jiao J., Wang R., Facile synthesis of calcium carbonate with an absolutely pure crystal form using 1-butyl-3-methylimidazolium dodecyl sulfate as the modifier, *Colloid Polym. Sci.*, 291 (2013), pp. 2191–2202.

ANNEXE

Description des Techniques d'Analyse Utilisées

I- Diagrammes des rayons X (DRX)

Les diagrammes de diffraction des rayons X ont été obtenues à l'aide d'un diffractomètre à compteur courbe CPS 120 INEL couplé à une interface et à un ordinateur, avec une anticathode au cobalt ($\lambda_{Co} = 1,7903 \text{ \AA}$, moyenne pondérée de $K\alpha_1$ et $K\alpha_2$).

L'analyse a été réalisée sur des composés pulvérulents ou après broyage des ciments dans un mortier en agate. La poudre a été tassée dans un porte échantillon circulaire ($S \approx 150 \text{ mm}^2$) de manière à obtenir une surface plane. Une attention particulière a été portée sur la préparation des analyses de la brushite, pour ne pas accentuer l'orientation préférentielle déjà très marquée due à une morphologie en plaquettes. Le temps d'acquisition a été de 1 h 30, sur un échantillon en rotation.

II-Spectroscopie d'absorption infrarouge

La spectrophotométrie d'absorption infrarouge fournit des renseignements précis sur la structure d'un composé. Lorsqu'une radiation infrarouge traverse une molécule, on constate une absorption sélective de la lumière aux fréquences de vibration caractéristiques des différentes liaisons.

L'analyse par spectroscopie infrarouge en transmission a été réalisée l'aide d'un spectromètre Nicolet série 5700 sur des pastilles constituées d'environ 2 mg de produit dispersé dans 300 mg de KBr. La gamme spectrale est comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution 4 cm^{-1} et 64 scans d'acquisition.

III- Mesure du temps de prise des ciments

La technique que nous avons utilisée dans ce travail est dite méthode Gillmore Needle ; cette méthode est décrite par la norme ASTM C 266-89 (standard).



Figure A-1 : Dispositif utilisé pour déterminer le temps de prise par la méthode Gillmore Needle

La méthode Gillmore Needle consiste à laisser une trace à la surface du ciment à l'aide de deux aiguilles de section circulaire. Une aiguille de grande section (2,13 mm de diamètre) supporte un poids de 113,4g (1/4 livre). Et une aiguille de petit section (1,06 mm de diamètre) supporte un poids de 453,2 g (1 livre). A l'aide de ces systèmes, les temps de prise initial (à l'aide de la petite aiguille) et final (à l'aide de la grande aiguille) sont déterminés lorsque les aiguilles ne laissent plus de trace visible à la surface de la pâte. La détermination de ce temps permet de définir le temps pendant laquelle le ciment peut être manipulé.

IV- Porosimétrie à mercure

La porosité des ciments a été déterminée par porosimétrie à mercure à l'aide d'un appareil Micromeritics Autopore III. Cette technique consiste à mesurer le volume de mercure ayant pénétré dans les pores de l'échantillon en fonction de la pression appliquée. Les mesures donnent la distribution de la taille des pores et le pourcentage de porosité des échantillons.

V- Test de résistance à la compression

L'essai de compression consiste à soumettre une éprouvette de ciment de forme cylindrique à deux forces axiales opposées, en la plaçant entre les plateaux d'une presse. La déformation du matériau en fonction de l'effort de compression est enregistrée en continu par un appareil de type HOUNSFIELD Série S (Figure A-2). Le résultat est une courbe charge-déplacement sur laquelle on peut distinguer deux domaines distincts : le domaine élastique et le domaine plastique. La déformation du ciment augmente jusqu'à la rupture. Cet essai permet donc de déterminer la valeur de la résistance à la compression.



Figure A-2 : Appareil pour essais de compression de type Hounsfield Série S.

VI- Microscopie Electronique à Balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est un outil de caractérisation en haute résolution de la surface d'objets dont la taille est comprise entre une dizaine de nanomètres et quelques millimètres. Son principe repose principalement sur la détection d'électrons rétrodiffusés par l'échantillon. Une faible quantité de poudre est déposée sur une bande de scotch double face collée sur un porte-échantillon en aluminium. Les échantillons sont ensuite métallisés à l'argent afin d'éviter le phénomène de charge de surface dû au faisceau d'électrons. L'ensemble est placé dans un microscope Leo 435 VP monté avec un détecteur à scintillation (détection des électrons secondaires).