



## Université de Lille

École Doctorale Biologie - Santé

### Thèse

pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de Lille  
Sciences de la Vie et de la Santé

#### DÉVELOPPEMENT D'UN ADHÉSIF INNOVANT BIO-INSPIRÉ POUR LA FIXATION OSSEUSE

Présentée et soutenue par

**Matthias Schlund**

**Le 18 Novembre 2022**

#### **Membres du Jury :**

Pr. Claire MAJOUFRE

Pr. Jean-Daniel KÜN-DARBOIS

Pr. Pierre WEISS

Pr. Joël FERRI

Université de Bordeaux

Université d'Angers

Université de Nantes

Université de Lille

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Dr. Feng CHAI

Dr. Joël LYSKAWA

Université de Lille

Université de Lille

Directrice

Directeur







*À Florence, mon roc*

*À Anatole & Ariane, mes étoiles*



# REMERCIEMENTS

---

Madame le Docteur Feng Chai & Monsieur le Docteur Joël Lyskawa,

Je vous remercie tous les deux d'avoir accepté de diriger ce travail et d'avoir mis en commun vos qualités et connaissances pour m'aider à le faire aboutir. Vous m'avez guidé avec bonté et sagesse, vous avez été disponibles tout au long de cette thèse. Je vous suis très reconnaissant.

Monsieur le Professeur Joël Ferri,

Vous êtes l'instigateur de ce projet, qui je le sais vous tient à cœur. Je suis reconnaissant de votre enseignement de la chirurgie maxillo-faciale et stomatologie que je mets en pratique au quotidien. Je vous remercie de votre soutien.

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

Madame le Professeur Claire Majoufre,

Je vous remercie pour vos conseils avisés lors des comités de suivi de thèse. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux dans votre équipe à Bordeaux.

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Pierre Weiss,

Je vous remercie pour vos conseils avisés lors des comités de suivi de thèse. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Jean-Daniel Kün-Darbois,

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie également :

Monsieur le Professeur Nicolas Blanchemain pour votre accueil au sein de l'U1008 depuis mon Master 2, ainsi que pour vos conseils avisés.

Monsieur le Professeur Patrice Woisel pour votre accueil au sein de l'UMET et votre soutien à ce projet.

Monsieur le Professeur Juergen Siepmann pour votre accueil au sein de l'U1008 depuis mon Master 2.

Mickaël Maton pour ton aide précieuse, tes conseils techniques mais aussi pour maintenir l'esprit de camaraderie au sein de l'U1008.

Julien Dartus, pour ton efficacité et ta bonne humeur, un Master 2 largement mérité !

Sarah Defrançois pour ton aide précieuse, grâce à toi je n'ai jamais été à court de nPDA !  
Alexandre Montanede pour ton aide pendant cette dernière année de thèse à distance.  
L'ensemble des équipes de l'U1008, de l'UMET et du DHURE.

Je remercie la Région Hauts-de-France ainsi que l'Université de Lille pour leur soutien financier.

Je remercie mon épouse, pour son amour, sa patience et sa compréhension de ce long parcours universitaire, mes enfants, pour leur joie de vivre quotidienne, mes parents, pour m'avoir tant donné sans jamais s'arrêter, mes grands-parents et Mamama, pour tout ce que vous m'avez apporté (je pense fort à ceux qui sont partis, j'aurai aimé que vous puissiez encore être là), mon frère, pour son optimisme inébranlable, mes beaux-parents, pour leur nouvel abonnement Strasbourg-Bordeaux.

Je remercie mes amis, de Strasbourg, de Lille ou d'ailleurs pour tous ces bons moments.

Je remercie Romain et Arnaud, pour ce soutien mutuel dans cette longue aventure hospitalo-universitaire, en effet comme le dit le Professeur Jay Cummings :

“ \*when the villain in the movie has a PhD\*

Viewers without a PhD: Ah, they are just saying he's a smart villain. Makes sense.

Viewers with a PhD: Ah grad school and academia drove him to madness. Makes sense.”





# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	7
PRINCIPALES ABRÉVIATIONS.....	15
RÉSUMÉ.....	19
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUCTION.....	25
2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	33
2.1 La cicatrisation ou consolidation osseuse.....	35
2.1.1 La consolidation primaire .....	35
2.1.2 La consolidation secondaire.....	36
2.2 La contention ou fixation des os.....	37
2.2.1 Indications .....	37
2.2.2 Les moyens de contention actuels et leurs limites.....	38
2.3 Les fondamentaux de l'adhésion et des adhésifs.....	40
2.4 Les adhésifs du tissu osseux.....	45
2.4.1 Le tissu osseux comme surface d'adhésion .....	45
2.4.2 L'adhésif osseux idéal.....	46
2.4.3 Les candidats potentiels .....	47
2.4.3.1 Adhésifs synthétiques.....	47
2.4.3.2 Adhésifs biologiques et biomimétiques .....	51
2.4.3.3 Conception de notre adhésif.....	62
2.4.4 Les méthodes d'évaluation des adhésifs osseux.....	63
2.4.4.1 Évaluation mécanique de l'adhésion .....	64
2.4.4.2 Évaluation mécanique en compression.....	67
2.4.4.3 Évaluation du temps de prise.....	68
2.4.4.4 Stérilisation de l'adhésif osseux .....	68
2.4.4.5 Évaluation biologique.....	69
2.5 Objectif de la thèse.....	79
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	81
3.1 Matériel.....	83
3.2 Méthode de préparation de l'adhésif avec ou sans nPDA.....	84
3.3 Optimisation de la formulation de l'adhésif par des tests mécaniques instrumentaux.....	84
3.3.1 Formulations à évaluer .....	84
3.3.2 Tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale.....	85
3.4 Caractérisation de l'adhésif optimisé .....	86

3.4.1	Tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale d'échantillons en os bovin <i>ex vivo</i> collés.....	86
3.4.2	Tests mécaniques manuels en traction d'un encollage de fibula sur tibia de rat <i>ex vivo</i> .....	87
3.4.3	Tests mécaniques en compression de l'adhésif seul.....	88
3.4.4	Mesure du temps de prise de l'adhésif.....	89
3.4.5	Test de minéralisation dans le fluide corporel simulé.....	89
3.5	Impact de la stérilisation sur les propriétés de l'adhésif optimisé.....	90
3.5.1	Processus de stérilisation appliqué.....	90
3.5.2	Évaluation de l'impact de la stérilisation sur l'adhésion.....	91
3.5.3	Évaluation de l'efficacité de la méthode de stérilisation par l'essai de stérilité..	91
3.6	Évaluation de la cytotoxicité de l'adhésif.....	91
3.7	Évaluation <i>in vivo</i> de l'adhésif.....	92
3.7.1	Animaux.....	92
3.7.2	Modèle d'ostéotomie tibiale.....	93
3.7.2.1	<i>Procédure chirurgicale</i> .....	94
3.7.2.3	<i>Évaluation microtomodensitométrie</i> .....	96
3.7.2.4	<i>Évaluation histologique</i> .....	96
3.7.3	Modèle de fixation d'autogreffe osseuse.....	96
3.7.3.1	<i>Procédure chirurgicale</i> .....	97
3.7.3.3	<i>Évaluation microtomodensitométrie</i> .....	99
3.7.3.4	<i>Évaluation histologique</i> .....	99
3.7.4	Modèle d'ostéotomie fibulaire.....	100
3.7.4.1	<i>Procédure chirurgicale</i> .....	101
3.7.4.3	<i>Évaluation microtomodensitométrie</i> .....	102
3.7.4.4	<i>Évaluation histologique</i> .....	102
3.8	Élaboration d'un adhésif biofonctionnalisé par chargement de ciprofloxacine sur les nanoparticules de polydopamine.....	102
3.8.1	Chargement de la ciprofloxacine sur les nPDA et évaluation de la libération de la ciprofloxacine par l'adhésif.....	103
3.8.2	Évaluation microbiologique de la fonctionnalisation à la ciprofloxacine de l'adhésif.....	103
3.8.2.1	<i>Test d'adhésion bactérienne et de croissance planctonique</i> .....	104
3.8.2.2	<i>Test de diffusion de Kirby-Bauer</i> .....	105
3.9	Statistiques.....	105
4.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	107
4.1	Optimisation de la formulation de l'adhésif.....	109

4.1.1	<b>Tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale d'échantillons en titane collés : criblage et optimisation de la formulation de l'adhésif</b> .....	109
4.1.2	<b>Effet du temps d'immersion sur l'adhésion de l'adhésif optimisé</b> .....	111
4.2	<b>Caractérisation de l'adhésif optimisé</b> .....	113
4.2.1	<b>Caractérisation de l'adhésion à l'os : tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale ex vivo d'échantillons d'os bovins collés</b> .....	113
4.2.3	<b>Caractérisation de la cohésion de l'adhésif : tests mécaniques en compression</b> .....	116
4.2.4	<b>Caractérisation du temps de travail : mesure du temps de prise</b> .....	117
4.2.5	<b>Caractérisation des capacités de minéralisation : test au fluide corporel simulé</b> ...	118
4.3	<b>Impact de la stérilisation sur les propriétés de l'adhésif optimisé</b> .....	121
4.3.1	<b>Impact sur les propriétés mécaniques de l'adhésif</b> .....	122
4.3.2	<b>Évaluation de l'efficacité de la méthode de stérilisation</b> .....	123
4.4	<b>Évaluation de la cytotoxicité de l'adhésif : test d'extraction</b> .....	123
4.5	<b>Évaluation <i>in vivo</i> de l'adhésif</b> .....	124
4.5.1	<b>Modèle d'ostéotomie tibiale</b> .....	124
4.5.1.1	<i>Évaluation macroscopique et radiographique</i> .....	125
4.5.1.2	<i>Évaluation microtomodensitométrique</i> .....	128
4.5.1.3	<i>Évaluation histologique</i> .....	131
4.5.1.4	<i>Conclusion – modèle d'ostéotomie tibiale</i> .....	136
4.5.2	<b>Modèle de fixation d'autogreffe osseuse</b> .....	136
4.5.2.1	<i>Évaluation macroscopique</i> .....	136
4.5.2.2	<i>Évaluation microtomodensitométrique</i> .....	138
4.5.2.3	<i>Évaluation histologique</i> .....	143
4.5.2.4	<i>Conclusion – modèle d'autogreffe osseuse</i> .....	147
4.5.3	<b>Modèle d'ostéotomie fibulaire</b> .....	148
4.5.3.1	<i>Évaluation macroscopique</i> .....	148
4.5.3.2	<i>Évaluation microtomodensitométrique</i> .....	149
4.5.3.3	<i>Évaluation histologique</i> .....	152
4.5.3.4	<i>Conclusion – modèle d'ostéotomie fibulaire</i> .....	155
4.6	<b>Fonctionnalisation antibactérienne de l'adhésif par chargement de ciprofloxacine sur les nanoparticules de polydopamine</b> .....	156
4.6.1	<b>Évaluation de la libération de la ciprofloxacine</b> .....	156
4.6.2	<b>Évaluation microbiologique de l'adhésif comprenant des nPDA fonctionnalisées à la ciprofloxacine</b> .....	157
4.6.2.1	<i>Test d'adhésion bactérienne et de croissance planctonique</i> .....	157
4.6.2.2	<i>Test de diffusion de Kirby-Bauer</i> .....	158

<b>5. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>163</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>185</b>
<b>RÉSUMÉ/ABSTRACT - VERSION GRAND PUBLIC.....</b>	<b>194</b>

## **PRINCIPALES ABRÉVIATIONS**

---



BCC	Bouillon Cœur-Cervelle
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CFX	Ciprofloxacine
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPC	Ciment Phospho-Calcique
DOPA	3,4-Dihydroxyphénylalanine
DRX	Diffraction aux Rayons X
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HA	Hydroxyapatite
MAP	<i>Mussel Adhesive Protein</i>
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
MFP	<i>Mussel Foot Protein</i>
MH	Mueller-Hinton
OE	Oxyde d'Éthylène
OPS	O-Phospho-Sérine ou Phosphosérine
PBS	Tampon Phosphate Salin ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PEEK	Polyétheréthercétone ( <i>Polyetheretherketone</i> )
PDA	Polydopamine
nPDA	Nanoparticules de Polydopamine
PLGA	Poly(acide lactique-co-glycolique) <i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyl) ( <i>Poly(methyl methacrylate)</i> )
QAS	Système d'Évaluation de la Qualité ( <i>Quality Assessment Scheme</i> )
SBF	Fluide Corporel Simulé ( <i>Simulated Body Fluid</i> )
TCP	Tricalcium Phosphate ( $\alpha$ ou $\beta$ )
TTCP	Tétracalcium Phosphate
$\mu$ TDM	Micro-Tomodensitométrie
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultraviolet
WHO	Organisation Mondiale de la Santé ( <i>World Health Organisation</i> )



---

## RÉSUMÉ

---

La fixation de fragments osseux, nécessaire dans la prise en charge des fractures, après une ostéotomie ou pour fixer une greffe osseuse, repose actuellement sur l'utilisation d'implants métalliques. Ces implants ne sont pas adaptés à toutes les situations (fractures comminutives, fractures articulaires, fractures pédiatriques) et sont sources de complications et d'interventions secondaires pour les retirer. Un adhésif osseux biorésorbable représenterait une excellente alternative pour relever ces défis. L'objectif de ce travail est de développer un tel adhésif osseux bio-inspiré composé d'un ciment phospho-calcique (le tétracalcium phosphate, TTCP), de phosphosérine (OPS) et de nanoparticules de polydopamine (nPDA).

La réalisation de tests mécaniques instrumentaux en traction sur des échantillons en titane collés bout-à-bout a permis de définir la formule chimique optimale suivante : 50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS-2%<sub>wt</sub>nPDA avec un ratio liquide/poudre de 0,21 mL/g (rupture de l'adhésion à  $2,75 \pm 0,65$  MPa à 24 h après collage en milieu physiologique). Les propriétés adhésives ont ensuite été évaluées *ex vivo* par des tests de traction instrumentaux avec des échantillons d'os cortical bovin collés bout-à-bout ainsi que par traction manuelle de greffes de fibula collées sur des tibias de rat : rupture de l'adhésion à  $1,28 \pm 0,26$  MPa et à  $0,69 \pm 0,12$  MPa respectivement à 24 h après collage en milieu physiologique). La résistance en compression de l'adhésif a par ailleurs été mesurée à  $10,85 \pm 3,88$  MPa. Ces résultats expérimentaux montrent des propriétés adhésives significativement supérieures de la formulation sans nPDA. L'ajout de nPDA entraîne également une minéralisation de l'adhésif plus précoce et plus importante lors du test d'immersion dans le SBF (*Simulated Body Fluid*). De plus, l'absence de cytotoxicité a été confirmée par des tests en contact indirect (ISO 10993-5) de l'adhésif avec des cellules pré-ostéoblastiques.

Après vérification de l'efficacité du processus de stérilisation et de son impact sur les propriétés adhésives, il a été retrouvé une supériorité de l'irradiation  $\gamma$  comparativement à l'oxyde d'éthylène. L'irradiation  $\gamma$  est donc la méthode adaptée de stérilisation de cet adhésif.

Trois modèles animaux utilisant le rat ont été développés pour évaluer *in vivo* la biocompatibilité et les propriétés adhésives de l'adhésif osseux : un modèle d'ostéotomie tibiale avec contraintes mécaniques fortes et deux modèles avec contraintes mécaniques faibles (ostéotomie fibulaire et un modèle de fixation d'autogreffe de fibula sur tibia). L'encollage par l'adhésif avec ou sans nPDA n'a pas permis une contention fiable des fragments dans les deux modèles d'ostéotomie en raison des limites du modèle et d'une résistance mécanique de l'adhésif trop faible. A l'inverse, dans le modèle d'autogreffe,

---

l'encollage permettait d'obtenir une tenue mécanique sans déplacement du greffon, sans toutefois différencier l'efficacité des adhésifs avec ou sans nPDA. Par contre, il a été noté de plus importants recouvrements de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA par du tissu osseux par rapport à l'adhésif sans nPDA.

Enfin, la possibilité de doter l'adhésif osseux de propriétés antibactériennes par le chargement de ciprofloxacine (CFX) dans les nPDA a été évaluée. Des tests microbiologiques (tests de diffusion) ont montré que l'adhésif fonctionnalisé permet la libération prolongée de la CFX et induit une action antibactérienne au moins jusqu'à 30 jours.

L'adhésif TTCP/OPS-nPDA a donc démontré des propriétés mécaniques et biologiques adaptées à la fixation du tissu osseux dans les zones de faibles contraintes. De plus, les nPDA peuvent servir de plateforme de fonctionnalisation pour ajouter de nouvelles propriétés, par exemple une action antibactérienne par chargement en CFX. Un renforcement mécanique de l'adhésif et le développement d'un modèle plus adapté utilisant un animal plus gros permettrait d'entrevoir son utilisation en zone de forte contrainte mécanique.

**Mots-clefs** : adhésif osseux ; adhésif biorésorbable ; modèle animal ; fixation osseuse

---

## ABSTRACT

---

Bone fixation, which is necessary when repairing bone fractures or an osteotomy site, or stabilizing bone grafts to reconstruct a bone defect, is currently performed with metallic implants. These implants are not suited to any situation (e.g. comminuted, articular or pediatric fractures), moreover, they are responsible of various complications and often require secondary removal surgeries. A bioresorbable bone adhesive would then be a promising candidate to overcome these challenges. Despite the evident clinical need, there are currently no such bone adhesives in clinical use. The aim of this study is to develop a bioinspired bone adhesive, made up of calcium phosphate cement (tetracalcium phosphate, TTCP), phosphoserine (OPS) and nanoparticles of polydopamine (nPDA).

The optimal formulation was screened, based on instrumental traction tests of glued end-to-end titanium samples, and found as 50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS-2%<sub>wt</sub>nPDA with a liquid-to-powder ratio of 0.21 mL/g (rupture at  $2.75 \pm 0.65$  MPa after 24 h under simulated physiological conditions). This adhesive was further characterized for its adhesiveness *ex vivo* on glued end-to-end bovine cortical bone samples ( $1.28 \pm 0.26$  MPa by instrumental traction tests) or on rat fibula glued to rat tibia ( $0.69 \pm 0.12$  MPa by customized manual traction tests) after 24 h in simulated physiological conditions; and for its resistance to compressive stress ( $10.85 \pm 3.88$  MPa). Comparing to that without nPDA, the adhesive with nPDA showed significantly superior adhesive properties, and led to a quicker and more abundant mineralization on the surface of the adhesive during immersion in a simulated body fluid. Moreover, the absence of cytotoxicity of the adhesive (85% cell survival) was confirmed *in vitro* by indirect contact test (ISO 10993-5) with pre-osteoblastic cells.

The sterilizability of the adhesive was investigated, comparing the effect of  $\gamma$  irradiation and ethylene oxide. The former was found more suitable than the latter, with full sterility assurance and no impact on the adhesive properties. Hence,  $\gamma$  irradiation was opted as the sterilization method for this adhesive.

Three rat models representing different clinical scenarios were developed to assess *in vivo* the biocompatibility and the adhesive properties of the bone adhesive: a tibial osteotomy model with high mechanical load and two models (fibular osteotomy model and fibular autograft fixation on tibia model) with low mechanical load. In both osteotomy models, no matter the mechanical load, the fracture fixation using the adhesive with or without nPDA failed to obtain a reliable stabilization of the bone fragments due to the limits of the model and the intrinsic mechanical weakness of the current adhesive. Encouragingly, in the autograft model, fixation by the adhesives was shown stable and without graft displacement, however, without

---

discriminating the adhesive efficacy between that with and without nPDA. Nevertheless, significant coverage of newly formed bone tissue on the TTCP/OPS-nPDA adhesive were found, certainly thanks to the osteoinductive property of nPDA.

Furthermore, the biofunctionalization of the adhesive to add antibacterial property through ciprofloxacin (CFX) loading on the nPDA was assessed. Microbiological studies (diffusion tests) showed a prolonged release profile of CFX from functionalized adhesive with an antibacterial activity minimally till 30 days.

So far, the TTCP/OPS-nPDA adhesive demonstrated an excellent biocompatibility and mechanical properties suited to the fixation of bone tissue under low mechanical load. Moreover, nPDA could be used as a functionalization platform to offer new biological activities, *e.g.* antibacterial activity via antibiotics loading. Enhancing the mechanical strength of the adhesive and testing it with a more suitable animal model, *i.e.* a large animal, might further improve its performance and allow application under high mechanical load.

**Keywords:** bone adhesive; bioresorbable adhesive; animal model; bone fixation





# **1. INTRODUCTION**

---



La fracture osseuse est une pathologie fréquente et ubiquitaire concernant les patients de toutes les classes d'âge (1). La prise en charge des fractures comprend la réduction du foyer de fracture en position anatomique suivie de l'immobilisation de ce foyer de fracture jusqu'à obtention de la consolidation osseuse. Cette immobilisation est le plus souvent réalisée chirurgicalement par ostéosynthèse à foyer ouvert avec implantation de matériel métallique : plaque, vis, clous. Malheureusement, ces implants métalliques ne sont pas adaptés à certaines situations, notamment les fractures comminutives (2), les fractures intra-articulaires (3) ou encore les fractures des patients pédiatriques dont le squelette est en croissance (4). De plus, ces implants peuvent occasionner des complications d'ordre mécanique ou d'ordre infectieux qui nécessiteront une intervention chirurgicale secondaire pour traiter cette complication et réaliser l'ablation de l'implant incriminé. D'autre part, certaines équipes promeuvent l'ablation systématique du matériel métallique, chaque fracture nécessitant dès lors deux interventions chirurgicales (5). Toutefois, l'ablation des implants métalliques n'est pas une chirurgie exempte de morbidité postopératoire (6). Cette seconde intervention chirurgicale est aussi source de coûts supplémentaires non négligeables pour les systèmes de santé dont le financement est le plus souvent limité (7). À titre d'exemple, les fractures de chevilles représentent 9% de toutes les fractures, 40% d'entre elles bénéficieront d'une ostéosynthèse métallique et 10 à 81% d'une ablation secondaire de ce matériel (8). L'étude américaine de Lalli *et al.* (7) retrouve 106384\$ de frais hospitalier pour 56 patients ayant bénéficié d'une ablation de matériel de cheville (sans compter les coûts sociétaux annexes comme l'arrêt de travail).

Un adhésif biorésorbable et biodégradable serait une excellente alternative aux implants métalliques. L'utilisation d'un adhésif permettrait de réaliser de façon plus aisée la contention des fractures, notamment des fractures comminutives ou intra-articulaires en évitant les écueils liés aux implants métalliques : nécrose osseuse par insuffisance vasculaire suite à l'abord sous-périosté extensif ou arthrose liée aux lésions cartilagineuses iatrogéniques. La capacité de l'adhésif à se résorber spontanément serait un atout majeur dans les cas de fractures pédiatriques où le squelette est en croissance et peut être limité par les plaques. De plus, la résorption complète du moyen de contention éviterait les interventions chirurgicales secondaires pour l'ablation du matériel d'ostéosynthèse et donc la morbidité et les coûts associés. L'adhésif osseux éviterait également les complications liées à l'utilisation d'implants métalliques telles que les complications mécaniques (mobilité secondaire du matériel, exposition du matériel) et infectieuses (infection de site opératoire et genèse d'un biofilm bactérien sur les implants). De plus, l'utilisation d'un adhésif pour le tissu osseux ne serait pas limitée aux fractures osseuses traumatiques. En effet, tout acte chirurgical nécessitant une consolidation ou une fusion entre deux fragments osseux pourrait bénéficier d'un tel adhésif.

Cela comprendrait notamment les types d'interventions chirurgicales suivantes :

- Les ostéotomies. Celles-ci sont pratiquées à divers endroits du squelette pour corriger une déformation osseuse congénitale ou acquise par section puis repositionnement des os. Par exemple, les ostéotomies maxillo-mandibulaires (chirurgie orthognathique ou de repositionnement des mâchoires) corrigent des dysmorphoses dento-squelettiques faciales ou les ostéotomies du tibia corrigent des déformations des membres inférieurs.
- La reconstruction par greffe osseuse. Les pertes de substances osseuses peuvent être reconstruites à l'aide de greffes osseuses corticales ou cortico-médullaires, d'origine autogénique ou allogénique. Ces greffes nécessitent une fixation pour leur ostéointégration ainsi que pour leur maintien dans la zone à combler.
- Les arthrodèses. La fusion entre deux os normalement joints par une articulation peut être réalisée à divers endroits du squelette, cette technique est principalement utilisée pour la prise en charge de problèmes rachidiens cervicaux et lombaires.

Par ailleurs, un adhésif pour le tissu osseux pourrait également être utilisé en conjonction avec des implants métalliques pour augmenter la stabilité primaire lors de l'implantation. Les implants dentaires sont actuellement la meilleure solution pour remplacer une dent manquante (9). Toutefois, la mise en charge de ces implants ne peut s'envisager qu'après un délai d'ostéointégration de plusieurs mois dans de nombreux cas. Une stabilité primaire plus importante pourrait permettre une mise en charge et donc en fonction plus rapide. Un tel adhésif pourrait également être utilisé lors de la mise en place d'implants métalliques prothétiques articulaires dans le cadre d'arthroplasties de hanche ou de genou.

Actuellement, il n'existe aucun adhésif commercialisé pour une utilisation sur le tissu osseux ou même de façon intracorporelle en général. Les seuls adhésifs commercialisés et utilisés en pratique clinique sont strictement limités à l'adhésion des tissus mous avec une application superficielle. Farrar (10) a listé les propriétés que devrait idéalement posséder un adhésif osseux. La capacité d'adhérer en milieu humide est le principal écueil à surmonter pour tout adhésif candidat à une application en milieu biologique. Cette adhésion en milieu humide doit bien évidemment être associée à la notion de biocompatibilité. Toutefois, les adhésifs utilisés de façon courante hors de la pratique clinique nécessitent pour la plupart un milieu sec et/ou présentent une toxicité biologique.

De nombreux matériaux synthétiques ont été étudiés comme potentiels candidats pour constituer un adhésif osseux : le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) et ses dérivés, les polycyanoacrylates, les polyuréthanes et les polymères fonctionnalisés par réaction de thiol-

ène (11). Ces matériaux de synthèse ne répondent pas au cahier des charges en raison de l'absence de biorésorption et de problèmes de toxicité tissulaire ce qui limite leurs applications potentielles chez l'humain. Actuellement, aucun adhésif osseux biocompatible et biorésorbable ne présente des propriétés adhésives satisfaisantes en environnement humide pour être utilisé cliniquement.

Dans ce contexte, il convient de suivre une approche plus biocompatible pour s'affranchir des problèmes de toxicité tissulaire. Les ciments phospho-calciques (CPC) sont utilisés en pratique clinique quotidienne dans le domaine de la régénération tissulaire osseuse en tant que substitut osseux (12), par exemple pour la reconstruction maxillo-mandibulaire préprothétique permettant la pose implantaire ou pour la reconstruction d'une perte de substance cranio-faciale. En effet, les CPC ont une composition chimique proche de la phase minérale du tissu osseux humain : l'hydroxyapatite. Leur excellente biocompatibilité, ainsi que leur ostéoconductivité sont reconnues de longue date (13,14). Il existe différents CPC dont les propriétés dépendent du ratio calcium sur phosphore (Ca/P). L' $\alpha$ -tricalcium phosphate ( $\alpha$ TCP), le  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ TCP), le tétracalcium phosphate (TTCP), l'hydroxyapatite (HA) et le calcium phosphate biphasique sont des CPC utilisés au quotidien depuis de nombreuses années (14). En raison de leur solubilité plus importante en condition de pH neutre, seuls le TTCP ou l' $\alpha$ TCP mélangé avec de l'eau forment une pâte qui se durcit progressivement en un ciment par un processus de dissolution-précipitation. Toutefois, ces ciments phospho-calciques n'ont quasiment aucune propriété adhésive avec le tissu osseux (15), limitant ainsi leur utilisation comme adhésif osseux.

Des études récentes (16–18) montrent que les propriétés adhésives de ces ciments phospho-calciques peuvent être significativement améliorées en s'inspirant des phénomènes d'adhésion observés dans la nature. En effet, certains animaux marins sont capables de produire des colles fonctionnant en milieu humide, notamment le ver marin californien *Phragmatopoma californica* (*sandcastle worm* ou « ver du château de sable ») qui construit des coquilles protectrices sous-marine en collant des grains de sable et des débris de coquilles par un mécanisme de coacervation complexe. Cette colle contient en grande quantité un acide aminé phosphorylé : la O-Phospho-Sérine (OPS) ou phosphosérine (19). L'association de l'OPS avec certains CPC produit un adhésif organo-minéral auto-réticulant et biocompatible (16–18). Par exemple, la Tetranite® (Revbio, Lowell, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique) est un adhésif osseux composé de TTCP et d'OPS qui durcit en quelques minutes en formant un solide multiphasique. Cet adhésif présente une capacité adhésive forte avec le tissu osseux et les métaux en milieu humide, tout en conservant les capacités ostéoconductives et la biocompatibilité des CPC (16). Par ailleurs, l'OsStic™ (17,20–22), composé d' $\alpha$ TCP, d'OPS et de métasilicate de calcium forme également un adhésif organo-minéral avec des

performances similaires à la Tetranite®. Ainsi, le développement d'adhésifs osseux associant l'OPS et un CPC semble une voie prometteuse pour la conception d'adhésifs osseux performants, biocompatibles et biodégradables.

En s'inspirant toujours des phénomènes observés dans la nature, notamment des excellentes capacités d'adhésion des moules (*Mytilus edulis*) sur les surfaces en milieu humide, il est possible d'améliorer davantage les propriétés d'adhésion, d'ostéoformation et de biocompatibilité des adhésifs organo-minéraux OPS/CPC. En effet, les moules adhèrent aux surfaces par l'intermédiaire de leur byssus qui contient de nombreuses protéines (*musssel foot proteins* (MFP) ou *musssel adhesive proteins*) riches en motif catécholamine responsables de cette extraordinaire adhésion (23). Ainsi, le polymère de polydopamine (PDA), inspiré de ces *MFPs* a rencontré un intérêt scientifique soutenu en tant que revêtement polymère polyvalent et biomimétique permettant la fonctionnalisation de nombreux (bio)matériaux, (24,25). En particulier, grâce à sa réactivité latente à l'égard des nucléophiles, la PDA est utilisée comme plateforme universelle de (bio)fonctionnalisation. Elle promeut la minéralisation (26), la prolifération ostéoblastique et l'ostéointégration des substituts osseux (27). Son association à des ciments phospho-calciques stimule la formation de tissu osseux et améliore l'adhésion du ciment au tissu osseux (28–30). Sous forme de nanoparticules (nPDA), la PDA peut être utilisée autrement qu'en revêtement et donc associé à un adhésif qui nécessite une prise *in situ*. Les nPDA présentent des capacités adhésives intrinsèques et une excellente affinité pour les protéines (31). De façon similaire à la PDA, elles adhèrent à des substrats variés (céramiques, métaux, polymères, etc.) (31–33). Les nPDA sont ostéo-inductives et génèrent un microenvironnement adapté à l'adhésion et la prolifération cellulaire promouvant la régénération tissulaire et notamment la formation de tissu osseux (31). Leur biocompatibilité ainsi que leur biodégradabilité sont bien documentées (30,34,35). Les nPDA, grâce à leurs propriétés adhésives et ostéo-inductives, peuvent ainsi être considérées comme des candidates idéales pour poursuivre l'amélioration de la performance globale des adhésifs osseux biomimétiques organo-minéraux.

Par ailleurs, le caractère novateur d'un tel adhésif soulève indubitablement la question de comment évaluer les propriétés physico-chimiques et biologiques de l'adhésif à travers des analyses *in vitro* jusqu'à la translation en application clinique. Plusieurs méthodes de tests mécaniques pour évaluer *in vitro* et *ex vivo* la force adhésive et la résistance à la compression des adhésifs organo-minéraux ont été décrites (16,17,36,37). Il en résulte une large gamme de capacité adhésive minimale dépendant du type d'os (cortical, médullaire ou mixte), du moyen de conservation de l'os (frais ou congelé), de la préparation de surface (polissage ou non, finesse du polissage) et du milieu expérimental : hygrométrie (sec ou humide) et température (ambiante ou corporelle à 37°C). De plus, les modèles animaux d'évaluation des

adhésifs osseux sont rares dans la littérature (38). En effet, seules la biocompatibilité, l'ostéointégration et la biorésorption des adhésifs organo-minéraux ont été évaluées jusqu'à présent (16,20). Toutefois, les rares applications concernant la capacité de fixation osseuse ont été réalisées dans des zones dépourvues de contraintes mécaniques comme la voûte crânienne (39), ou en association avec des vis métallique, capable à elles seules d'assurer la fixation osseuse (40). Il n'existe actuellement pas de données dans la littérature démontrant l'efficacité *in vivo* d'un adhésif biomimétique organo-minéral dans la prise en charge d'une fracture en condition clinique.

Le but de ce travail de thèse est de développer un adhésif osseux bio-inspiré composé d'un ciment phospho-calcique (le tétracalcium phosphate), d'O-phospho-sérine et de nanoparticules de polydopamine. Il s'agit tout d'abord d'optimiser la formulation de l'adhésif, de caractériser ses propriétés mécaniques, de biominéralisation, l'effet des processus de stérilisation ainsi que d'évaluer sa cytocompatibilité. Ensuite, la biocompatibilité et les propriétés adhésives de l'adhésif optimisé seront évaluées *in vivo* en utilisant trois modèles animaux chez le rat. Ces modèles se rapprochent des différentes utilisations futures : un modèle d'ostéotomie du tibia correspondant à une fracture en zone contrainte, un modèle d'ostéotomie de la fibula correspondant à une fracture en zone faiblement contrainte et un modèle d'autogreffe osseuse de fibula sur le tibia correspondant à une reconstruction osseuse par autogreffe. Finalement, les possibilités de biofonctionnalisation de l'adhésif par l'intermédiaire des nPDA seront étudiées.



## **2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## 2.1 La cicatrisation ou consolidation osseuse

L'os est le principal tissu dur du corps humain. C'est un tissu conjonctif dont la particularité est sa minéralisation, responsable de sa dureté et de sa résistance. Il est composé d'une matrice protéique collagénique et non collagénique, supports d'une minéralisation par l'hydroxyapatite, ainsi que de cellules des lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques. Le squelette a un rôle dans la locomotion et la mastication en association avec le tissu musculaire, ainsi que dans la protection de divers organes comme le cerveau dans le crâne ou l'œil dans l'orbite. Le tissu osseux est en perpétuel remodelage. Le cycle de remodelage comprend une phase de résorption osseuse suivie d'une phase de formation osseuse. Ce remodelage concerne la totalité du squelette, il s'adapte en permanence aux contraintes mécaniques.

Lorsqu'une lésion du tissu osseux advient comme une fracture, le tissu osseux cicatrise : c'est la consolidation osseuse. Il existe deux modes de consolidation : la consolidation directe ou primaire et la consolidation indirecte ou secondaire.

### 2.1.1 La consolidation primaire

La consolidation primaire ou directe est le mode de consolidation le moins commun puisqu'il nécessite une réduction anatomique parfaite (intervalle entre les fragments de moins de 1 mm) et une absence quasi-totale de contraintes mécaniques (41). La consolidation primaire nécessite donc une contention rigide. Il existe deux modes de consolidation primaire, tous les deux basés sur le remodelage osseux physiologique (41–43):

- La cicatrisation de contact nécessite un espace entre les fragments osseux de moins de 0,01 mm et un stress mécanique sous 2%. Le processus est similaire au remodelage physiologique avec une action première des ostéoclastes générant des cavités qui seront comblées par de l'os produit par les ostéoblastes. Il y a donc restauration de la continuité osseuse et du système Haversien de façon simultanée. Le système Haversien permet la pénétration par les vaisseaux sanguins qui apportent des précurseurs ostéoblastiques. Le tissu mûrira ensuite en os lamellaire par remodelage direct sans formation d'un cal périosté.
- La cicatrisation lacunaire diffère de la précédente puisque l'union osseuse et le remodelage Haversien n'est pas simultané. L'intervalle ne doit pas dépasser le millimètre. Dans ce cas, la fracture est d'abord comblée par de l'os lamellaire orienté perpendiculairement au grand axe, mécaniquement faible qui est secondairement remodelé pour recréer un système Haversien.

### 2.1.2 La consolidation secondaire

Le processus de consolidation secondaire ou indirecte est un processus en quatre étapes intriquées entre elles (41–44) :

- Première étape : l'inflammation

Le processus inflammatoire débute immédiatement après l'occurrence de la fracture. Il y a formation d'un hématome associé à une réaction inflammatoire qui va entraîner la coagulation de l'hématome autour des fragments osseux. Il servira de modèle pour la formation du cal en étant progressivement remplacé par du tissu de granulation riche en fibrine.

- Deuxième étape : la formation du cal mou fibrocartilagineux

L'ossification est à la fois intramembraneuse et endochondrale. D'une part, des cellules souches mésenchymateuses sont recrutées et se différencient en cellules chondrogéniques et fibroblastiques à l'origine de l'ossification enchondrale entre les fragments fracturés. D'autre part, au niveau périosté et endosté, les cellules progénitrices se différencient en ostéoblastes. Une apposition osseuse intramembraneuse débute alors, formant un manchon d'os réticulaire du côté périosté et remplissant le canal médullaire par de l'os réticulaire du côté endosté. Une angiogenèse a lieu au sein de ce cal, permettant le succès de la consolidation.

- Troisième étape : la formation du cal dur osseux

Cette étape débute dès que les fragments sont unis par le cal fibrocartilagineux. Le tissu cartilagineux est converti en tissu osseux calcifié (os réticulé). Il commence en périphérie de la fracture, où les contraintes mécaniques sont plus faibles et progresse vers le centre de la fracture. A la fin de cette étape un cal dur calcifié d'os immature est formé.

- Quatrième étape : le remodelage

Cette dernière étape débute dès que les fragments sont unis par de l'os réticulaire. Ce dernier est remplacé par de l'os lamellaire suivant un processus d'érosion de surface et de remodelage ostéonal. Il ne s'achèvera que l'os retrouvera sa morphologie initiale.

La consolidation secondaire est bien plus fréquente que la consolidation primaire, c'est la consolidation « naturelle ». Elle ne nécessite pas une réduction parfaite avec contact inframillimétrique entre les fragments osseux. De légères sollicitations mécaniques ainsi que des micromouvements sont possibles sans empêcher la cicatrisation osseuse. La contention nécessaire est donc moins rigide que pour la consolidation directe (41,42).

## **2.2 La contention ou fixation des os**

### **2.2.1 Indications**

La fracture est une solution de continuité au sein d'un os. C'est une pathologie extrêmement fréquente, ubiquitaire (1). Elle est induite par un traumatisme : accident de la voie publique, chute ou accident domestique, rixe, accident sportif. Elle peut donc toucher tous les individus quel que soit leur âge, leurs antécédents médicaux, leur situation socio-professionnelle. La prise en charge des fractures comprend la réduction du foyer de fracture en position anatomique suivie de l'immobilisation de ce foyer de fracture jusqu'à obtention de la consolidation osseuse. Certaines fractures non déplacées et bien engrenées sont « naturellement » immobilisées et ne nécessitent qu'une surveillance ou une rééducation (45), mais la grande majorité des fractures nécessiteront une contention orthopédique ou chirurgicale. L'immobilisation de différents fragments osseux est nécessaire à la consolidation osseuse. En effet, une mobilité entre les fragments osseux ou l'application de forces trop importantes entraîneront un retard de consolidation, voire une pseudarthrose (46).

Les ostéotomies chirurgicales ont pour but la création d'une solution de continuité au sein d'un os afin de corriger sa morphologie. La chirurgie orthognathique comprend la réalisation d'ostéotomies maxillaires et mandibulaires pour corriger une dysmorphose dento-squelettique faciale en modifiant la position des mâchoires (47). Les ostéotomies du tibia ont pour but la ré-axation du tibia et donc de la jambe en modifiant son axe (48). Ces ostéotomies nécessitent un moyen de contention, identique aux fractures traumatiques, afin de maintenir la nouvelle position définie par le chirurgien et permettre la consolidation osseuse.

Outre la fracture traumatique ou induite, les techniques de reconstruction des pertes de substance osseuse peuvent également nécessiter une fixation. Ces pertes de substances osseuses peuvent avoir diverses origines : lésion traumatique, exérèse tumorale bénigne ou maligne, défaut de substance congénital ou encore édentement dans le cas particulier des os maxillaires et mandibulaires. Les greffes d'os cortical ou cortico-médullaire, d'origine autogénique ou allogénique, sont notamment utilisées pour la reconstruction de perte de substances du squelette cranio-facial (49,50), à visée préprothétique au niveau maxillo-mandibulaire (51,52), ou encore pour traiter les cas de pseudarthrose des membres (53). Il est nécessaire de fixer les autogreffes pour éviter leur mobilisation secondaire, donc s'assurer du comblement de la zone défectueuse, tout en permettant leur ostéointégration (54,55). De façon similaire, les autogreffes osseuses vascularisées, utilisées pour reconstruire des pertes

de substance plus larges, nécessitent également une fixation pour obtenir une intégration avec le tissu osseux adjacent (56).

La contention entre deux os peut également être envisagée de façon définitive : c'est le cas de l'arthrodèse qui fusionne deux os physiologiquement reliés par une articulation. Elle peut être un traitement de dernier recours au niveau des membres (57). C'est une technique couramment réalisée au niveau du rachis cervical (58) ou lombaire (59).

Enfin, les notions de contention et de consolidation peuvent être élargies à l'ostéo-intégration. En effet, l'ostéo-intégration d'implants métalliques, c'est-à-dire l'intégration au sein du tissu osseux de corps étrangers métalliques, nécessite les mêmes conditions d'absence de mobilité et de contrainte pour avoir lieu. De très nombreux implants métalliques sont apposés quotidiennement dans les os, notamment les implants dentaires (60) et les arthroplasties de hanche et de genou (61). Les implants dentaires sont actuellement la meilleure solution pour remplacer une dent manquante (9). Toutefois, la mise en charge de ces implants ne peut s'envisager qu'après un délai d'ostéointégration de plusieurs mois dans de nombreux cas. Une stabilité primaire plus importante pourrait permettre une mise en charge et donc en fonction plus rapide. L'augmentation du couple à l'insertion permet théoriquement d'augmenter la stabilité primaire mais la compression de l'os est responsable d'une ostéolyse délétère (62,63). L'association d'un adhésif biorésorbable lors de l'implantation pour augmenter la stabilité primaire est donc séduisante.

Les interventions nécessitant un moyen de fixation du tissu osseux permettant une consolidation entre deux fragments ou l'ostéo-intégration d'un implant métallique sont donc nombreuses.

### **2.2.2 Les moyens de contention actuels et leurs limites**

L'immobilisation d'un os peut être réalisée de deux manières : orthopédique ou chirurgicale. La contention orthopédique repose sur des dispositifs externes sans exposition chirurgicale de l'os à traiter : ce sont les plâtres, attelles rigides, corset ou au niveau maxillo-facial le blocage maxillo-mandibulaire. Ces moyens de contention ont toujours leurs places dans l'arsenal thérapeutique actuel en raison de leur efficacité et de leur coût modeste (64,65). Toutefois, ils retardent la mise en fonction et ne sont pas exempts de complications (66). Les indications de traitement orthopédique sont devenues très limitées depuis l'avènement des méthodes d'ostéosynthèse avec implants métalliques qui permettent une remise en fonction plus rapide (67).

Actuellement, la contention chirurgicale des fractures repose sur du matériel d'ostéosynthèse métallique, principalement en alliage de titane ou en acier inoxydable (42). Au niveau du massif facial, l'alliage de titane est exclusivement utilisé. Les fractures sont abordées chirurgicalement, réduites puis immobilisées à l'aide d'implants métalliques. Ce matériel comprend des plaques métalliques qui sont transvissées ou des clous implantés dans la médullaire des os longs. Une contention stricte et donc rigide, sans contrainte mécanique appliquée à l'os, associée à une réduction anatomique des fragments osseux permettra une consolidation directe ou primaire. Cette contention peut être obtenue par l'utilisation de plaques transvissées. La contention rigide en compression est difficile à réaliser (46), il est dans de nombreux cas préféré une contention semi-rigide qui entraînera une consolidation indirecte ou secondaire, tout aussi robuste. C'est le cas des enclouages centro-médullaires, des plaques transvissées verrouillées, ou encore des mini-plaques utilisées en traumatologie cranio-faciale (41,68).

Les implants métalliques ne sont toutefois pas adaptés à toutes les situations. Trois situations sont particulièrement inadaptées à ces implants :

- *Les fractures comminutives* : ce sont des fractures complexes à traiter car les fragments sont multiples et de petites tailles. La mise en place de vis et de plaques nécessite l'abord des fragments et donc le retrait de leur couverture périostée. Or le périoste assure la vascularisation de ces fragments qui peuvent alors nécroser malgré la réduction anatomique (2).
- *Les fractures intra-articulaires* : ces fractures sont sources de complications fonctionnelles, puisque la cicatrisation du tissu osseux n'est pas un critère suffisant, il faut également obtenir la cicatrisation des surfaces articulaires cartilagineuses pour éviter l'arthrose à plus long terme. Le matériel métallique ne doit pas faire issue au sein de l'articulation, ce qui limite son intérêt (3).
- *Les fractures pédiatriques dans un squelette en croissance* : les enfants ont un squelette en croissance qui tolère mal un implant qui, lui, conserve sa taille. De plus, si le traumatisme lui-même est inducteur de troubles de croissance, le matériel métallique peut également être à l'origine de tels troubles par lésion du cartilage de croissance (4). Dans le cas des fractures mandibulaires pédiatriques, il est très difficile de réaliser une ostéosynthèse sans léser les germes des dents définitives en position intra-osseuse.

Un adhésif osseux résorbable serait plus adapté à ces trois problématiques, tout en pouvant efficacement remplacer le matériel d'ostéosynthèse métallique non seulement dans

les autres types de fractures mais également dans les autres indications nécessitant une contention chirurgicale : les ostéotomies chirurgicales, les fixations de greffe osseuses et les arthrodèses. En effet, l'adhésif permettrait d'une part le maintien de la réduction (anatomique dans les fractures traumatiques ou corrective dans les cas d'ostéotomie) ou du greffon pour combler la perte de substance et d'autre part assurerait la contention jusqu'à consolidation osseuse.

De plus, les implants d'ostéosynthèse métalliques peuvent être à l'origine de complications mécaniques, par mobilité secondaire des vis d'ostéosynthèse, ou infectieuses. Ces complications nécessiteront une intervention chirurgicale secondaire afin de retirer ces implants (69). Par ailleurs, de nombreuses équipes recommandent l'ablation systématique de tout implant métallique dès lors qu'il présente une gêne symptomatique ou non (5). L'ablation du matériel d'ostéosynthèse est donc une intervention chirurgicale très fréquemment réalisée. Toutefois, elle présente, comme toute intervention chirurgicale une morbidité propre (6) ainsi qu'un coût économique élevé pour la société (7) : hospitalisation, intervention chirurgicale, soins postopératoires, arrêt de travail, *etc.* Un adhésif osseux résorbable permettrait d'éviter ces interventions d'ablation secondaire du matériel. Il réduirait ainsi la morbidité ainsi que le coût économique de la prise en charge notamment des fractures mais aussi des ostéotomies ou des fixations de greffes osseuses. Dans le cas des arthrodèses, le matériel métallique est destiné à une implantation définitive avec une ostéointégration de l'implant métallique. L'utilisation d'un adhésif résorbable remplacé par du tissu osseux permettrait une fusion des os plus biologique suivant les principes de la régénération et du remodelage osseux.

Finalement, l'adhésif pourrait également être utilisé conjointement avec l'implant métallique quand celui-ci a une fonction prothétique (implant dentaire, arthroplastie) pour augmenter la stabilité primaire et accélérer la mise en fonction, notamment au niveau des implants dentaires.

### **2.3 Les fondamentaux de l'adhésion et des adhésifs**

Avant de discuter des adhésifs potentiels du tissu osseux, il est nécessaire de s'intéresser plus généralement à la science de l'adhésion, un domaine pluridisciplinaire touchant à la chimie, la physique, la mécanique, la rhéologie, la conception et l'ingénierie.

L'adhésion est l'attraction de deux substances différentes par les forces intermoléculaires entre les substances (70). L'adhésion repose sur un triptyque comprenant :

- *La science des surfaces* : la composition chimique de la surface mais également sa texture physique et sa propreté affecteront les performances de l'adhésif. La surface étudiée dans ce travail est le tissu osseux, et dans une moindre mesure le titane.
- *La géométrie du joint* : la forme géométrique du joint impactera la performance de l'adhésif en fonction de la direction et de l'intensité des contraintes mécaniques. Plus la surface du joint est importante, plus l'adhésion pourra être forte. La forme du joint sera définie lors des différents tests *in vitro* et *in vivo* dans ce travail afin d'obtenir une meilleure reproductibilité des analyses.
- *La composition de l'adhésif* : la composition chimique de l'adhésif déterminera ses capacités adhésives qui seront plus ou moins adaptées à des surfaces différentes. La recherche d'un adhésif adapté au tissu osseux est l'objet de ce travail.

Les adhésifs sont utilisés par les humains dans leur vie quotidienne depuis des centaines de milliers d'années (71). Un adhésif est défini comme une substance capable de maintenir ensemble deux surfaces de façon permanente (70). Les caractéristiques requises d'un adhésif sont les suivantes (70) :

- comportement similaire à un liquide afin de s'écouler sur la surface à coller pour obtenir un contact intime adhésif-surface
- fixation à la surface par adhésion (développement de forces intermoléculaires)
- durcissement afin de soutenir des charges mécaniques variables ou continues de façon pérenne
- transfert et distribution des charges mécaniques entre les composants assemblés
- comblement des cavités et des espaces
- association avec les autres composants pour fournir un produit durable

L'adhésif doit donc recouvrir les surfaces, générer l'adhésion et la maintenir tout en assurant la gestion des charges mécaniques. L'adhésion peut être obtenues selon plusieurs mécanismes. En effet, sept théories de l'adhésion, non exclusives entre elles sont décrites (72) :

- *Théorie de l'adsorption ou théorie thermodynamique* : l'adhésion est liée à la tension de surface (73). L'adhésion provient des forces d'interactions moléculaires très localisées entre les matériaux, ces forces incluent des interactions acide-base, des liaisons hydrogènes faibles ainsi que des forces de van der Waals (73). Une bonne mouillabilité entraîne une bonne adhésion. Les tissus biologiques

intracorporels sont hydrophiles avec un contenu en eau dans le squelette évalué à 25% de sa masse (74). Les biomatériaux interagissant avec le tissu osseux doivent présenter une importante mouillabilité pour obtenir une adhésion cellulaire et donc la formation de tissu osseux au contact (75). L'adhésion thermodynamique participera donc à l'adhésion osseuse.

- *Théorie chimique de la liaison covalente* : un lien covalent est un lien dans lequel deux atomes partagent une paire d'électrons. Un lien covalent a une énergie 1000 fois supérieure à la tension de surface, ce sont donc des liens puissants (72). Cette forme d'adhésion étant la plus forte, c'est celle qui est recherchée dans un adhésif osseux. La composition chimique de celui-ci devra donc permettre des liens covalents avec le tissu osseux.
- *Théorie acide-base* : un acide, qui accepte un électron, est lié à une base, qui donne un électron, en partageant une paire d'électrons données par la base, formant un lien coordonné (72). L'hydroxyapatite, le composant de la phase minérale des os présentent des sites d'adsorption basiques et acides (76,77) qui permettront des réactions acide-base avec un adhésif.
- *Théorie de l'imbrication mécanique* : l'imbrication mécanique peut être de deux types : friction ou queue-d'aronde. L'adhésif pénètre dans les irrégularités, les crevasses ou les pores (78). Les facteurs géométriques mais aussi la rugosité de la surface ont une influence importante sur l'adhésion : les surfaces polies adhèrent moins que les surfaces rugueuses. L'emboîtement mécanique augmente la surface collée et donc l'adhésion (79). Le polissage des surfaces lors des essais mécaniques *in vitro* diminuera l'adhésion en réduisant l'imbrication mécanique, toutefois le tissu osseux, même cortical, ne présentera jamais une surface parfaitement uniforme en raison de sa microstructure par travées haversiennes. L'imbrication mécanique sera toutefois présente lors des applications cliniques, en effet, les surfaces osseuses ne sont jamais polies avant d'être mises en contact. Cette imbrication est même recherchée lors de la réduction des fractures.
- *Théorie des couches frontières faibles* : les couches frontières faibles peuvent être d'ordre mécanique (bulles d'air, impuretés de surface, etc.) ou d'ordre chimique (contamination de surface par lubrifiant ou additif, surface inactivée ou usée, etc.). Elles sont donc responsables d'une diminution de la force d'adhésion (80). Elles peuvent être diminuées en préparant la surface avant de réaliser l'adhésion, par exemple en polissant les échantillons afin de retirer la couche superficielle contaminée avant de réaliser un test mécanique *in vitro*. Toutefois, lors d'une application *in vivo*, il est impossible d'obtenir une surface vierge d'impuretés ou de contamination par des fluides biologiques.

- *Théorie de l'adhésion électrostatique* : les deux matériaux adhérant l'un à l'autre sont comme les plaques d'un condensateur électrique qui transfèrent les charges électriques de l'un à l'autre (81). L'adhésion est attribuée aux forces électrostatiques. C'est le mécanisme de l'adhésion d'une poudre sur une surface solide (82,83). Cette théorie ne s'appliquera donc pas pour les adhésifs osseux, aucun n'étant sous forme de poudre.
- *Théorie de la diffusion* : elle est basée sur le concept de la solubilité d'un matériau dans le deuxième. Dans ce cas, quand les matériaux sont mis en contact, ils se dissolvent l'un dans l'autre avec formation d'une interphase sans discontinuité (84). Cette théorie ne s'appliquera pas pour les adhésifs osseux qui n'ont pas pour vocation de dissoudre le tissu osseux mais d'être remplacé par lui.

L'utilisation d'une colle à os devrait donc entraîner une adhésion par théorie de la liaison covalente, théorie thermodynamique et théorie acide-base. La théorie de l'imbrication mécanique et celle des couches frontières faibles pourront jouer un rôle variable en fonction de la préparation de la surface. En effet, une surface plane polie sans contamination ne permettra qu'une imbrication mécanique minimale tout en évitant les couches frontières faibles. Toutefois, l'évaluation de la force de l'adhésion ne requière pas l'étude des théories impliquées mais la rupture de l'adhésion et l'analyse de celle-ci. En effet, si l'adhésion est une attraction de deux substances différentes, il existe alors une résistance mécanique à la séparation de ces deux substances qui peut être étudiée et quantifiée. Il convient de définir le concept « opposé » à l'adhésion, la cohésion, qui est la résultante des forces intermoléculaires à l'intérieur d'une seule substance, donc la résistance mécanique à la séparation de la substance elle-même. La mise en tension du joint adhésif peut donc aboutir à une rupture adhésive ou cohésive ou mixte (70). La rupture adhésive est une rupture de l'interface entre l'adhésif et la surface à coller, elle signifie la faillite de l'adhésion elle-même. La rupture cohésive quant à elle est une rupture au sein de l'adhésif, elle signifie la faillite de la tenue mécanique de l'adhésif lui-même.

Outre la définition du type de rupture, la recherche de l'adhésif ayant les meilleures propriétés adhésives nécessite un criblage par des tests mécaniques standardisés permettant de quantifier la force de l'adhésion. En effet, plus la force appliquée pour rompre l'adhésion est élevée, plus l'adhésion sera considérée comme forte. Plusieurs variables doivent être contrôlées pour assurer cette standardisation (70) : la préparation des surfaces à coller, le temps écoulé entre la préparation des surfaces et l'application de l'adhésif, la procédure de mélange des composants de l'adhésif, les conditions et les méthodes d'application de l'adhésif, les conditions (pression, température, temps) lors de la prise et après la prise

jusqu'au test, etc. Différents types de tests peuvent ensuite être réalisés à l'aide d'instruments de mesure pour quantifier la force nécessaire pour aboutir à la rupture (70) :

- *Test de traction uniaxiale* : deux forces opposées sont appliquées de façon orthogonale à la surface collée jusqu'à rupture de l'adhésion.
- *Test de cisaillement* : deux forces opposées sont appliquées de façon parallèle à la surface collée jusqu'à rupture de l'adhésion.
- *Test de flexion dit « trois points »* : une force est appliquée au niveau médian de façon orthogonale à la surface collée et deux autres forces opposées sont appliquées de part et d'autre du point médian, à distance égale, de façon orthogonale à la surface collée jusqu'à rupture de l'adhésion.
- *Tests de fatigue* : ces tests peuvent être réalisés en traction uniaxiale ou en cisaillement. Les forces sont appliquées de façon transitoire et répétée jusqu'à rupture de l'adhésion.
- *Test de pelage (peel test)* : une surface est pelée par rapport à l'autre surface, cela nécessite un collage comprenant au moins un matériau souple, cela n'est donc pas adapté à un collage entre deux matériaux solides comme de l'os ou du métal.
- *Test de clivage* : ce test est l'équivalent du test de pelage pour des matériaux solides. La contrainte est en compression sur une seule extrémité de l'échantillon. Ce test est bien plus compliqué à mettre en œuvre que le test de pelage (70).
- *Test d'impact* : l'échantillon inférieur présente une surface plus importante que l'échantillon supérieur. Un marteau frappe alors l'échantillon inférieur jusqu'à rupture de l'adhésion. Il est peu usité car il est très difficile d'obtenir des résultats reproductibles (70).
- *Test de fluage* : ce test évalue les changements au sein de l'adhésif sous tension au cours du temps. Il est très difficile à mettre en place et n'est donc que rarement réalisé (70).

Des normes pour chacun de ces tests sont édités par l'ASTM International (anciennement American Society for Testing and Materials). Toutefois, ces normes requièrent des échantillons dont les dimensions et les formes sont précisément spécifiées. Si cela est aisé dans le cas de matériaux fabriqués artificiellement, il est extrêmement difficile de créer des échantillons standardisés avec du tissu biologique, a fortiori du tissu osseux. Les tests dont les résultats sont déjà difficilement reproductibles (test d'impact) ou dont la mise en place est complexe (test de clivage ou test de fluage) avec des matériaux spécifiquement usinés ne seront donc pas adaptés à l'évaluation d'un adhésif osseux. Ces tests sont par ailleurs peu réalisés lors de l'évaluation des adhésifs « classiques » (70). Les tests les plus fréquemment utilisés et les mieux adaptés aux matériaux solides (donc du tissu osseux) sont les tests

« simples » en traction uniaxiale, en cisaillement ou en flexion trois points. Bou-Francis et Ghanem proposent une méthodologie standardisée pour l'évaluation d'un adhésif osseux en utilisant uniquement des tests en traction uniaxiale et en cisaillement permettant d'obtenir des résultats fiables (36). Des tests en traction uniaxiale, selon leur méthodologie, seront réalisés dans ce travail.

## 2.4 Les adhésifs du tissu osseux

### 2.4.1 Le tissu osseux comme surface d'adhésion

Le tissu osseux est composé d'une phase minérale à 65%, d'une matrice organique, de cellules et d'eau (85). La phase minérale est composée d'hydroxyapatite dans sa quasi-totalité. La matrice organique est composée à 90% de collagène et à 10% de protéines non-collagéniques : ostéocalcine, ostéonectine, ostéopontine, fibronectine, sialoprotéine osseuse, *bone morphogenetic proteins, etc.* (85). Les cellules présentes dans le tissu osseux sont les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes.

Le tissu osseux est présent sous deux formes chez un humain mature :

- L'os cortical : c'est un os dense aux canaux microscopiques et donc très faiblement poreux. Il représente 80% de la masse squelettique. Il a un rôle principalement biomécanique, de support des charges et de protection (86).
- L'os trabéculaire : c'est un os à faible densité composé d'un lavis de travées osseuses, donc très poreux. Il représente 20% de la masse squelettique. Il a un rôle dans l'homéostasie phospho-calcique mais aussi dans la répartition des charges mécaniques (86).

La surface du tissu osseux varie donc beaucoup entre os cortical et trabéculaire. L'imbrication mécanique est beaucoup plus importante dans l'os trabéculaire puisque l'adhésif pourra s'écouler entre les travées osseuses et augmenter la surface de contact.

De plus, les surfaces osseuses peuvent être dans l'un des trois stades fonctionnels suivants : ostéogenèse, résorption osseuse ou quiescence (86). Les surfaces en cours d'ostéogenèse sont couvertes d'ostéoblastes et d'ostéoïde qui est le précurseur du tissu osseux mature. Les surfaces en cours de résorption présentent des cavités (les lacunes de Howship) contenant des ostéoclastes. Les surfaces quiescentes sont couvertes de cellules bordantes avec une couche d'1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur d'ostéoïde entre ces cellules et l'os proprement dit. Si l'on considère comme surface un os récemment fracturé ou découpé, il y aura un hématome et des cellules inflammatoires (cf 2.1.2). L'os est un tissu biologique et

donc ses surfaces ne sont pas inertes. La surface de l'os présentera ainsi toujours des impuretés qui diminueront l'adhésion.

Outre la texture ou la contamination biologique de la surface, la contrainte majeure du tissu osseux comme surface adhésive est le milieu physiologique qui est aqueux et homéotherme à 37°C. L'adhésion aura donc lieu en milieu humide exclusivement ce qui limite grandement le nombre d'adhésifs candidats potentiels.

#### **2.4.2 L'adhésif osseux idéal**

La volonté d'utiliser un adhésif pour fixer le tissu osseux est ancienne. A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, Themistocles Gluck, pionnier de l'arthroplastie, a conçu le premier ciment orthopédique à base d'amalgame de cuivre, de plâtre de Paris et de résine de pierre ponce ou de gypse utilisé lors de la pose de ses prothèses en ivoire (87). Il proposait également l'utilisation de « Lithocolle », une mixture de résine, de cire d'abeille, de poudre d'ocre rouge et d'essence de térébenthine, utilisée par les naturalistes (88,89), pour coller le tissu osseux (90). Hedri, en 1931, propose la première colle à os à base de collagène et de protéines fibreuses, c'est l'« Ossocol » (90). Si les résultats initiaux étaient encourageants, de nombreuses sévères réactions allergiques ont stoppées son développement. La recherche d'un adhésif osseux se poursuit depuis lors.

L'adhésif osseux idéal, tel que défini par Farrar (10), devrait comprendre les caractéristiques suivantes :

- Une capacité d'adhésion élevée sur le tissu osseux malgré la présence de contaminants organiques comme les protéines, le tissu adipeux, *etc.*
- Une adhésion sur des surfaces humides / une force adhésive stable dans un environnement aqueux
- Une stabilité mécanique à la tension, la compression et le cisaillement
- Une préparation et une application aisées et rapides en conditions chirurgicales
- Un temps de travail adapté, permettant au chirurgien d'appliquer la colle et de réduire les fragments
- Un temps de prise rapide (moins de 10 minutes)
- Une faible réaction exothermique lors de la prise, sans nécrose d'origine thermique des tissus
- Une biocompatibilité de la colle mais aussi de ses constituants et de ses produits de dégradation

- Une stérilisabilité
- Une conservation en milieu de stockage adéquate
- Un rapport coût-efficacité favorable
- Une manufacture commercialement viable

De plus, quatre autres éléments sont jugés désirables par Farrar (10) :

- Une adhésion aux alliages métalliques (acier, titane, chrome-cobalt-molybdène)
- Une biodégradabilité contrôlée
- L'absence de conditions de stockage particulières (une stabilité en température ambiante)
- La possibilité de libérer des médicaments ou substances bio-actives pour stimuler la cicatrisation osseuse, prévenir les infections, *etc.*

Aucun adhésif osseux n'est actuellement commercialisé, l'adhésif idéal est actuellement recherché.

### **2.4.3 Les candidats potentiels**

Il existe de nombreuses molécules ou macromolécules dont les capacités d'adhésion ont suscité de l'intérêt pour coller le tissu osseux. Certaines de ces molécules sont synthétiques tandis que d'autre sont biologiques.

#### *2.4.3.1 Adhésifs synthétiques*

##### 2.4.3.1.1 Poly(méthacrylate de méthyl)

Le poly(méthacrylate de méthyl) (PMMA) est utilisé en pratique clinique depuis de nombreuses années. Il est utilisé dès 1939 pour la réalisation d'épithèses (91) puis pour la confection de prothèses articulaires dès 1945 (92,93). Il est ensuite utilisé comme mortier pour la fixation d'implants dès 1953 (94). Le PMMA n'a que très peu de propriété d'adhésion intrinsèque à l'os et tout particulièrement à l'os cortical (95). Il agit comme un mortier en pénétrant dans les porosités du tissu osseux (96). Il est principalement utilisé lors de la mise en place de prothèses articulaires des membres inférieurs, mais aussi pour reconstruire des pertes de substances, soit directement en tant que produit de comblement de perte de substance en zone non contrainte comme le crâne (97) ou indirectement par la technique de la membrane induite décrite par Alain Charles Masquelet (98,99). La réaction de

polymérisation du PMMA est fortement exothermique, pouvant entraîner des nécroses des tissus adjacents, tandis que le monomère à la base de la réaction est toxique en cas de libération dans le corps (100,101). Le PMMA n'a donc que peu d'intérêt en tant qu'adhésif.

Toutefois, deux approches ont été explorées pour améliorer les capacités adhésives du PMMA :

- L'ajout de 4-méthacryloyoxyéthyl triméllitate anhydride (4-META) au monomère de MMA pour le rendre hydrophile ainsi que de tri-n-butyle borane (TBB) comme initiateur de polymérisation pour diminuer la production de radicaux libres. Le « 4-META/MMA-TBB » présente une force adhésive supérieure au PMMA dans le cadre de la fixation de prothèses fémorales chez l'animal (102), il diminue la cytotoxicité et favorise l'ostéoconductivité (103), même si une cytotoxicité lors de la phase initiale de polymérisation a été notée (104). Il convient toutefois de mentionner que le PMMA est connu pour être responsable d'une résorption osseuse à long terme (105). Son utilisation n'est pas envisagée comme adhésif du tissu osseux mais comme adhésif en odontologie pour la couverture de la pulpe dentaire ou la fixation de prothèses dentaires (106,107).
- L'ajout d'un agent amphiphile au PMMA hydrophobe permet l'adhésion à l'os hydrophile. Cet adhésif comprend des monomères hydrophobes de méthyl méthacrylate ainsi que des groupes fonctionnels hydrophiles de type hydroxyles et acides carboxyliques (108,109). Il a permis la fixation de plaques d'ostéosynthèse métalliques à l'os crânien dans un modèle *in vivo* avec succès et sans toxicité à court terme (110).

Ces deux approches permettent au PMMA d'obtenir des capacités d'adhésion améliorées, toutefois, il n'est aucunement question de coller des fragments osseux directement. Le PMMA est en effet non biodégradable (111), il ne peut donc être appliqué entre des fragments à l'instar d'une colle.

#### 2.4.3.1.2 Autres colles comprenant des dérivés de l'acrylate

Le méthacrylate de 2-dihydroéthyle peut se réticuler avec des polyesters insaturés biodégradable comme le polypropylène fumarate. Une telle combinaison, associée à des nanoparticules de bioverre a démontré une capacité adhésive en milieu humide *in vitro* ainsi que des propriétés de biominéralisation et de biodégradation *in vitro* (112). Une version alternative composée de poly(butyle fumarate)/poly(propylène fumarate) réticulé avec du diacrylate et associé à de la nanopoudre d'hydroxyapatite a également démontré de bonnes

propriétés adhésives ainsi qu'une cytocompatibilité et une dégradabilité adaptée *in vitro* (113). Toutefois, il n'existe aucune étude *in vivo* sur ces colles (114).

Par ailleurs, une matrice de poly(éthylène glycol) diméthacrylate avec un additif composé de polymères étoilés d'isocyanate co-polymérisés avec de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène a été proposée comme adhésif biologique en raison de ses capacités d'adhésion en environnement humide (115). La matrice a ensuite été modifiée par l'ajout de céramiques comme de la struvite, de la newbéryite ou du gypse afin d'augmenter la porosité et de favoriser la croissance osseuse au sein de la colle. Cette colle est cytocompatible, toutefois la force adhésive de la formulation reste limitée avec une cible limitée au seuil de 0,2 MPa après 24 heures dans un tampon phosphate sur des échantillons d'os cortical bovin.

#### 2.4.3.1.3 Polycyanoacrylates

La première commercialisation d'une colle cyanoacrylate (cyanoacrylate de méthyle) date de 1958 (116). La transposition clinique a été très rapidement envisagée avec l'application de cyanoacrylate de n-butyle en spray à visée hémostatique lors de la guerre du Viêt Nam par l'armée des États-Unis d'Amérique (117). Toutefois, l'application en pratique clinique a ensuite été bloquée par l'autorité de régulation américaine, la *Food and Drug Administration* (FDA), en raison de préoccupations quant à sa toxicité potentielle (116). En parallèle, l'Histoacryl Blue® (cyanoacrylate de n-butyle) développée par Bernd Braun est commercialisée en Allemagne en 1968 pour la fermeture de plaies cutanées (118). C'est le premier adhésif à visée médical commercialisé. Depuis lors, l'intérêt des cyanoacrylates pour coller des tissus biologiques a été étudié de façon extensive (10).

Néanmoins, il a été rapidement révélé l'histotoxicité importante des cyanoacrylates à chaînes courtes : cyanoacrylates de méthyle ou d'éthyle (119,120). Ces molécules sont impropres à une utilisation clinique.

Les cyanoacrylates à chaînes longues, notamment le cyanoacrylate de n-butyle, sont ceux utilisés en pratique clinique comme adhésif des tissus mous. Le cyanoacrylate de n-butyle est le polycyanoacrylate qui présente le meilleur résultat lors de tests mécaniques *ex vivo* (121). Il a été utilisé dans une étude clinique pilote, publiée en 1987, pour la contention de fractures de mandibule, en remplacement d'implants métalliques d'ostéosynthèse (122). Aucune suite n'a toutefois été donnée à cette étude pilote, ce qui fait suspecter des problèmes de toxicités liés à la colle. D'autres essais ont toutefois été menés par la suite, notamment des essais *in vivo* chez le lapin utilisant des cyanoacrylates pour fixer des autogreffes osseuses en comparaison avec des greffes transvissées (123,124). En effet, le volume des greffons à 6 semaines (124) ou 16 semaines (123) ne présentait pas de différences significatives entre les

groupes colles et témoins (transvissage), ce qui a été considéré comme un succès. Mais il a été quand même noté par une de ces études (123) une différence significative vis-à-vis de la réaction inflammatoire en défaveur du groupe colle. De plus, dans d'autres études, l'incorporation de la greffe à la zone greffée est décrite comme retardée (125) voire absente (126) en lien avec des réactions inflammatoires importantes et persistantes. Une telle histotoxicité entraînant une inflammation et une réaction à corps étranger est donc reconnue pour le cyanoacrylate de n-butyle (120).

L'utilisation clinique actuelle des cyanoacrylates en tant qu'adhésif est strictement limitée au tissu cutané. Une extension de l'indication au collage des tissus intracorporels, et donc de l'os, nécessiterait une validation de leur innocuité. La littérature à ce sujet est contradictoire depuis soixante ans. Par ailleurs, la seule indication des cyanoacrylates en utilisation intracorporelle est limitée à la sclérothérapie, qui repose sur les propriétés inflammatoires et fibrosantes de ces polymères.

#### 2.4.3.1.4 Polyuréthanes

Les implants en polyuréthanes se sont développés dès les années 1950 au niveau des valves cardiaques artificielles (127) et des prothèses mammaires (128) avec une biocompatibilité reconnue. Les polyuréthanes représentent l'une des plus anciennes tentatives d'adhésif osseux. L'« Ostamer » est une mousse adhésive en polyuréthane biodégradable développée dans les années 1950 qui a été testée cliniquement. Les résultats de cet essai clinique n'ont pas été positifs (129) avec des destructions du polymère, un relâchement des liens os-polymère, un fort taux d'infection et de réactions inflammatoires à corps étranger.

Le développement des polyuréthanes dispersés en milieu aqueux a entraîné une deuxième tentative de développement d'un adhésif osseux avec une application clinique. Celle-ci était basée sur un polyuréthane provenant d'huile de castor associé à un isocyanate et du carbonate de calcium (Kryptonite, Doctor Research Group, Connecticut, États-Unis d'Amérique). Cette colle a été initialement validée par la FDA en 2009 notamment pour la fermeture sternale en raison de résultats biomécaniques positifs associés à une biocompatibilité (130). Toutefois, il s'est avéré qu'en utilisation intracorporelle à 37°C, les propriétés adhésives de la colle étaient divisées par deux. Cette colle a été retirée du marché en 2012 (131).

Un nouvel adhésif composé d'une mousse de polyuréthane associée à des nanoparticules d'hydroxyapatite est en cours de développement avec des résultats initiaux encourageants (132). Toutefois, de nombreuses études sont encore nécessaires pour aboutir à une application clinique.

#### 2.4.3.1.5 Polymères fonctionnalisés par réaction de thiol-ène

La réaction de type thiol-ène permet de former des liaisons covalentes très résistantes en condition humide. L'adhésif est composé d'unités tris(2-(3-mercaptopropionyloxy)éthyl)isocyanurate et de 1,3,5-triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H, 3H, 5H)-trione ainsi que de particules d'hydroxyapatite (133). Une méthode de patch adhésif renforcé par des fibres (*fiber-reinforced adhesive patch*) basé sur la réaction de thiol-ène a été développée (133,134). L'adhésif résultant présente une biocompatibilité et de bons résultats biomécaniques à travers un modèle animal de rat. Toutefois, il convient de préparer les surfaces, d'appliquer un apprêt (*primer*), de le faire sécher, d'appliquer la colle, de photopolymériser, d'appliquer la couche de fibre puis finalement une nouvelle couche de colle à photopolymériser. Cette colle ne peut donc être utilisée au niveau des surfaces à coller mais doit s'envisager en apposition sur la face externe de l'os, de façon similaire à la plaque métallique. Elle a d'ailleurs été testée en association avec des vis et a montré de bonnes propriétés adhésives (135).

Ces nombreuses étapes d'application rendent la technique, telle que définie actuellement, moins attractive pour une utilisation chirurgicale en raison d'une durée de réalisation longue et complexe. En effet, la réduction doit être tenue pendant tout le temps d'application, l'accès doit être largement ouvert pour permettre la photopolymérisation, et du sang ou d'autres tissus biologiques pourraient interférer à chacune des étapes d'application.

#### 2.4.3.2 Adhésifs biologiques et biomimétiques

##### 2.4.3.2.1 Fibrine

Les colles de fibrine sont commercialisées depuis de nombreuses années : la première autorisation de mise sur le marché par la FDA date de 1998 (136). La cascade de la coagulation se termine par la conversion du fibrinogène en fibrine en présence de thrombine et de chlorure de calcium. Les colles de fibrine utilisent ce phénomène naturel pour former des caillots de fibrines. En effet, lors de l'application sont mélangées du fibrinogène, du facteur XIII, du chlorure de calcium, de la thrombine et un agent anti-fibrinolytique (137). Tous ces ingrédients sont des molécules biologiques naturellement présentes chez l'humain, la biocompatibilité est donc excellente (137). Ces colles sont principalement utilisées à visée hémostatiques, en effet, la force adhésive est très faible (138,139), ce qui les disqualifie pour coller le tissu osseux.

#### 2.4.3.2.2 Colle de la Grenouille *Notaden bennetti*

La grenouille crucifix (*crucifix toad*) australienne *Notaden bennetti*, sécrète une colle au niveau de sa peau dorsale pour se défendre contre ses prédateurs. La colle de la grenouille *Notaden bennetti* fonctionne en milieu humide et adhère aux surfaces biologiques. Cette colle est un hydrogel protéique riche en glycine, proline, glutamine et tout particulièrement en 4-hydroxy-proline (140). Beaucoup de protéines présentes dans les adhésifs biologiques sont riches en glycines et prolines avec des modifications post-translationnelles comme des glycosylations ou des hydroxylations, l'hydroxyproline est par exemple également retrouvée au niveau du byssus des moules (141,142). Cette colle a été évaluée dans un modèle ex vivo d'adhésion de cartilage bovin ex vivo où elle a démontré une adhésion ( $97 \pm 9$  N/m) supérieure aux colles de fibrines ( $20 \pm 3$  N/m) mais inférieure aux cyanoacrylates ( $149 \pm 10$  N/m) (143). Sa biocompatibilité semble bonne (144). Toutefois, elle n'a jamais été étudiée pour une fixation osseuse qui nécessite une adhésion largement supérieure à la fermeture de plaies de tissus mous.

#### 2.4.3.2.3 Polysaccharides

Les sucres, notamment le chitosan présentent un mécanisme d'adhésion au tissu osseux et une excellente biocompatibilité. Les groupes aldéhydes vont se lier de façon covalente aux acides aminés en présence d'eau par réaction de Schiff (145). Un adhésif composé d'un mélange de chitosan et d'amidon ou de dextran présente des capacités adhésives ( $0,27 \pm 0,06$  MPa) supérieures aux colles de fibrine (145). Un autre adhésif, développé plus récemment, composé de chitosan, de carbonate de calcium et d'hydroxyapatite présente des capacités adhésives ( $0,024 \pm 0,0036$  MPa) inférieures (146,147). Dans les deux cas, l'adhésion reste faible et ne semble donc pas la plus adaptée pour une utilisation avec le tissu osseux.

#### 2.4.3.2.4 Association d'acide tannique et de fibroïne de soie

L'acide tannique est un composé phénolique retrouvé dans de nombreuses plantes. Les composés phénoliques peuvent se réticuler avec des protéines pour générer des réseaux organisés avec une adhésion résistante à l'eau mimant les mécanismes d'adhésion des moules (148). L'association d'acide tannique avec des fibroïnes de soie et de l'hydroxyapatite forme un hydrogel hybride organique-inorganique d'assemblage spontané. La force adhésive retrouvée lors d'une expérimentation ex vivo sur de l'os porcine est faible, de l'ordre de 0,9 MPa

après 30 minutes. La biocompatibilité et la biodégradabilité de cet adhésif a été démontré *in vivo* avec un modèle animal d'implantation sous-cutanée chez trois rats (149). L'adhésion a été ensuite évaluée *in vivo* avec un modèle de fracture du fémur chez le rat comparant quatre fémurs fracturés sans fixation avec quatre fémurs fracturés encollés. Après 8 semaines, la résistance osseuse du fémur encollé lors de tests de flexion trois points était la même que celle d'un fémur sain (149). Par ailleurs, le comblement de pertes de substance osseuses de taille critique par cette colle améliore la régénération osseuse comparativement à des *scaffolds* de fibroïne de soie ou à l'absence de reconstruction (149). Il semble donc que cette colle associe propriétés d'adhésion et de régénération osseuse.

#### 2.4.3.2.5 Byssus des moules *Mytilus edulis*

Les moules communes *Mytilus edulis* vivent fermement accrochées aux rochers ou aux bouchots dans la zone de balancement des marées par leur byssus. L'extrémité du byssus en contact avec la surface rocheuse est composée de plusieurs protéines appelés *mussel foot proteins* (MFP) ou *mussel adhesive proteins* (MAP). Ces protéines sont responsables des excellentes propriétés adhésives du byssus car elles sont riches en DOPA, une molécule contenant le motif catécholamine responsable de cet extraordinaire adhésion (23,150).

Différents adhésifs inspirés par les propriétés adhésives du byssus sont actuellement en cours de développement, toutefois ceux-ci sont plutôt destinés aux tissus mous (25,151). Parmi ceux-ci, on trouve, par exemple : un hydrogel élaboré à partir de polyéthylène glycol ramifié fonctionnalisé par des motifs catéchol (152) ou un hydrogel protéique incorporant une molécule fp-1 MAP recombinante (153). Ces propriétés adhésives reposent sur la chimie des catécholamines qui nécessite un contrôle du fin du pH et des conditions oxydantes (151,154). Ces adhésifs dérivés du byssus des moules sont en cours de développement pré-clinique avec des essais *in vitro* uniquement.

#### 2.4.3.2.6 Ciments phospho-calciques

Les ciments phospho-calciques (CPC) sont utilisés en pratique clinique quotidienne dans le domaine de la régénération tissulaire osseuse en tant que substitut osseux depuis 1975 (14,155). Ils permettent de combler des pertes de substance osseuses au niveau du squelette, ou plus particulièrement au niveau maxillo-mandibulaire, de permettre une implantation ultérieure (chirurgie préprothétique). La famille des CPC comprend plusieurs molécules classées selon leur ratio calcium sur phosphore (Ca/P), notamment :

- Les tricalciums phosphates (TCP), de forme  $\alpha$  ou  $\beta$ , dont le ratio Ca/P est de 1,5
- L'hydroxyapatite (HA) dont le ratio Ca/P est de 1,67

- Le tétracalcium phosphate (TTCP) dont le ratio Ca/P est de 2

Les CPC sont actuellement utilisés comme substitut osseux en raison de leur biocompatibilité et de leurs propriétés d'ostéointégration et d'ostéoconduction (13,14). L'hydroxyapatite constitue la phase minérale du tissu osseux, ce qui explique l'intérêt de ces molécules pour la reconstruction osseuse.

Le TTCP ou l' $\alpha$ TCP, en condition de pH neutre, se mélangent avec de l'eau et forment une pâte qui se durcit progressivement en un ciment par un processus de dissolution-précipitation en raison de leur solubilité plus importante dans l'eau. Le TTCP en particulier compose plusieurs ciments phospho-calciques à prise spontanée commercialisés actuellement comme par exemple HydroSet® (Stryker, Kalamazoo, Michigan, États-Unis d'Amérique) ou Mimix® (Zimmer, Warsaw, Indiana, États-Unis d'Amérique).

Toutefois, les ciments phospho-calciques ne présentent quasiment aucune propriété adhésive avec le tissu osseux : une force adhésive de 0,05 MPa est décrite (156), ce qui limite leur utilisation en tant qu'adhésif osseux. Une alternative qui pourrait être envisagée est le remplacement du phosphore par le magnésium : ce sont les ciments phospho-magnésiens (farringtonite). Ils auraient un potentiel de dégradation plus fiables (157,158) et une meilleure affinité avec le tissu osseux (159) que les ciments phospho-calciques. L'association de farringtonite avec de l'acide phytique produit un ciment qui présente des capacités adhésives supérieures aux ciment phospho-calciques (160). Ce ciment améliore la prise de vis implantés dans du tissu osseux (161). Toutefois, les propriétés adhésives des ciments phospho-magnésiens restent très faibles et ils sont plutôt développés comme des substituts osseux et non comme des adhésifs (162,163).

Une autre solution pour améliorer les propriétés adhésives des ciments phospho-calciques consiste à ajouter des adjuvants. Par exemple, la phase aqueuse d'un ciment brushitique composé de monocalcium phosphate et  $\beta$ TCP peut être remplacée par du polypropylène glycol-co-lactide diméthacrylate ce qui modifie les propriétés du ciment qui devient flexible et donc plus facile à manier, tout en réduisant le temps de prise (164). S'il permet une fixation osseuse immédiate, il n'a pas démontré de différence en terme d'efficacité par rapport à l'absence de contention dans un modèle de fixation de fracture de fibula chez le lapin (164). L'ajout de composants organiques pourrait également être envisagé, conduisant aux adhésifs organo-minéraux, qui seront discutés dans la section 2.4.3.2.8.

#### 2.4.3.2.7 Colle du ver *Phragmatopoma californica*

Le ver marin californien *Phragmatopoma californica* (sandcastle worm ou « ver du château de sable ») sécrète un adhésif lui permettant de constituer des coques de protection

à partir de grains de sable et de morceaux de coquilles (165). Cette colle protéique fonctionne en milieu marin via un mécanisme de coacervation complexe (166,167). La moitié (en pourcentage molaire) des acides aminés qui la composent sont des sérines ou des glycines, 95% des sérine étant phosphorylées (O-Phospho-Sérine ou phosphosérine) (19) et le tiers des tyrosine sont hydroxylées en DOPA (19). Cette colle comprend également des ions calcium et magnésium qui ont un rôle multifonctionnel dans le mécanisme d'adhésion, dans la réticulation et la cohésion de la colle (168).

Un adhésif dérivé de la colle de ce ver marin composée d'un copolymère de phosphate et de dopamine (poly(phosphate monoacryloxyéthyle)-co-dopamine) fonctionnant par coacervation complexe a ainsi été développée (19,166). Cet adhésif présente une adhésion maximale évaluée à 765 kPa (166). Deux modèles *in vivo*, évaluant l'adhésif en apposition ou pour la fixation d'un volet osseux sur le crâne de rats démontrent sa biocompatibilité ainsi que des propriétés ostéoconduites (169). Cependant, les propriétés adhésives n'ont pas été évaluées *in vivo*. La colle de ce ver marin a aussi servi de modèle pour l'élaboration d'une autre colle synthétique à partir de chaînes de poly(*N*-isopropylacrylamide) thermosensibles greffées sur des polyélectrolytes chargés de façon opposée. Cette colle synthétique a démontré des propriétés adhésives en milieu humide mais ses performances adhésives (0,1 kPa à 20°C et 5 kPa à 50°C pour un collage d'acide polyacrylique sur du verre) semblent largement insuffisantes pour coller du tissu osseux (170).

#### 2.4.3.2.8 Adhésifs organo-minéraux bio-inspirés

Dans le domaine des biomatériaux, la nature est source d'inspiration. Pour obtenir une caractéristique particulière, il s'agit souvent de reproduire le comportement d'un matériau naturel. La biocompatibilité, les propriétés d'ostéointégration et d'ostéoconduction des ciments phospho-calciques sont reconnues (13,14), mais ils ne présentent qu'une capacité d'adhésion à l'os minimale (156) (comme discuté ci-dessus : 2.4.3.2.6). L'ajout de composants organiques, notamment issus d'animaux marins puisque l'adhésif devra fonctionner en milieu humide, pourraient améliorer ces propriétés adhésives.

L'O-phospho-sérine ou phosphosérine (OPS), un acide aminé phosphorylé, est présente en grande quantité dans la colle sécrétée par le ver *Phragmatopoma californica* et participe aux propriétés adhésives de cette colle (19). En tant qu'acide aminé, l'OPS est biocompatible (169). De plus, l'OPS est abondante dans les protéines de la matrice extracellulaire osseuse comme l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse ou l'ostéocalcine. Elle induit la nucléation de l'hydroxyapatite (171) et promeut la différenciation ostéoblastique (172). Elle participe donc à la formation de tissu osseux. L'OPS serait donc une excellente candidate pour améliorer les propriétés des ciments phospho-calciques. Deux équipes de recherche ont

justement développés des adhésifs organo-minéraux auto-réticulants composés d'OPS et d'un CPC (première publication en 2018 pour chacune) : le TTCP pour le Tetranite® (16) et l' $\alpha$ TCP pour l'OsStic™ (17).

Ces deux composés, l'OPS organique et le CPC minéral, sont intimement liés au niveau moléculaire par des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes (17). Leur adhésion au tissu osseux serait expliquée par une importante énergie de surface et de charges électriques, des liaisons hydrogènes et une excellente mouillabilité de l'adhésif (17,173–175) ainsi que la grande affinité des phosphates pour l'hydroxyapatite (par des liens ioniques entre les ions calciums et phosphates) (16,176,177). La minéralisation de l'interface ciment ensuite la couche organique liée à la surface, tandis que la minéralisation du réseau organique à l'intérieur de l'adhésif crée une réticulation qui augmente la cohésion (17). De plus, l'adhésion n'est pas limitée au tissu osseux mais également au titane probablement par des liens ioniques et covalents (16), en effet les phosphates sont connus pour former des liaisons solides avec les oxydes métalliques comme le  $\text{TiO}_2$  (178).

#### 2.4.3.2.8.1 Adhésif organo-minéral composé d'OPS et de TTCP (Tetranite®)

Le Tetranite® est développé par RevBio (Lowell, Massachusetts, États-Unis d'Amérique), une entreprise américaine créée en 2014 dont la première publication scientifique date de 2018 (16). C'est un adhésif organo-minéral composé d'OPS et de TTCP dont la composition précise n'est pas mentionnée à l'exception du ratio liquide/poudre (0,21 mL/g) (16). La force adhésive a été évaluée par des tests mécaniques instrumentaux en cisaillement avec un collage bout-à-bout de divers échantillons (os cortical, os trabéculaire, titane, PEEK, etc.). La force adhésive retrouvée est d'environ 2 MPa avec les échantillons osseux corticaux et 3 MPa avec les échantillons en titane présentant une surface polie (16). Cet adhésif présente donc une force adhésive largement supérieure aux colles biologiques citées ci-dessus. Toutefois, la disposition bout-à-bout est normalement utilisée pour un test en traction uniaxiale et non pour le cisaillement (70,36), aucune précision quant au montage du test mécanique n'est donnée dans la publication. Le non-respect des normes entraîne des difficultés pour comparer les études entre elles. La rupture était mixte adhésive et cohésive dans le cas des échantillons en titane et cohésive dans le cas des échantillons osseux. La réaction entraînée par le mélange d'OPS et de TTCP a été étudiée (179), il est produit un complexe de phosphosérine calcique monohydrate formant un réseau coordonné adhésif capable en outre d'initier la calcification osseuse.

Une deuxième évaluation mécanique a été réalisée *ex vivo* dans un modèle d'ostéotomie de mandibule canine. Ce modèle vise à recréer la situation d'une fracture

mandibulaire et permet donc de tester l'adhésif dans une situation imitant l'utilisation clinique future. La mandibule était réduite puis fixée de diverses manières et l'évaluation était faite en flexion avec porte-à-faux (180). Les différentes méthodes de fixation étaient comparées à l'association d'une fixation osseuse par fil d'acier et d'une fixation interdentaire concomitante par du composite bis-acryl (fixation des couronnes des dents de part et d'autre de la fracture mandibulaire). L'association de Tetranite® et de fil d'acier présentait une adhésion supérieure au groupe contrôle (180). Le Tetranite® seul, le Tetranite® associé à une plaque en titane ou à une plaque en Tetranite® présentaient une adhésion inférieure par rapport au groupe contrôle (180). Ce test est proche de l'utilisation clinique ultérieure en comparaison avec les tests instrumentaux en cisaillement. Toutefois, la fixation des fractures mandibulaires par du fil d'acier associé à du composite en interdentaire n'est plus utilisée actuellement (181). En effet, le *gold standard* actuel du traitement des fractures du corps de la mandibulaire est l'ostéosynthèse par plaque en titane transvissée qui n'est pas utilisée dans cette étude.

Avant d'évaluer les propriétés adhésives *in vivo*, la biocompatibilité du Tetranite® a d'abord été étudiée *in vivo* dans un modèle de comblement de perte de substance de taille critique dans le condyle fémoral médial du lapin. Ce modèle a permis de démontrer la biocompatibilité du Tetranite®, sa dégradabilité (77,5% à 52 semaines) et son ostéointégration avec croissance de tissu osseux au sein de l'adhésif (16).

Les propriétés adhésives *in vivo* du Tetranite® ont été évaluées par un modèle de fixation de volet crânien chez la brebis (39). L'os pariétal de ces brebis était prélevé puis repositionné dans le site de prélèvement de façon bilatérale. Les animaux étaient divisés en trois groupes : fixation circonférentielle par la colle, fixation de la moitié de la circonférence par de la colle ou fixation par 3 plaques métalliques d'ostéosynthèse transvissées (groupe contrôle). L'analyse mécanique par test de poussée (*pushout test*) a démontré une adhésion statistiquement supérieure des deux groupes fixés par la colle par rapport au groupe contrôle à 12 semaines et 1 an (39). Il est à noter un desserrement des vis sur 4 des 6 sites traités par plaques d'ostéosynthèses transvissées à 1 an, ce qui est particulièrement élevé si l'on considère les capacités reconnues d'ostéointégration du titane. L'analyse histologique met en évidence dans les zones comblées par l'adhésif une dégradation progressive de l'adhésif et son remplacement par du tissu osseux (environ 47% de tissu osseux et 49% d'adhésif à 1 an, 80% de tissu osseux et 16% d'adhésif à 2 ans) pour le groupe circonférentiel, tandis que les zones non comblées par l'adhésif dans le groupe contrôle présentent à 1 an une quantité importante de tissu mou (52%) contre 48% de tissu osseux, à 2 ans ce tissu mou (25%) est en partie remplacé par du tissu osseux (75%) (39). Cette étude équivaut à une évaluation de la fixation d'une autogreffe en zone non contrainte. Les auteurs soulignent la faible quantité de tissu mou dans les zones comblées par l'adhésif. Toutefois, la faible stimulation mécanique explique la lenteur de la consolidation osseuse. La quantité de tissu osseux à 1 an est similaire dans les

zones comblées et non comblées. De plus, la dégradation n'est pas du tout la même que dans le modèle précédent : 77,5 % de l'adhésif était dégradé chez le lapin à 1 an tandis que 51% de l'adhésif était dégradé chez le mouton à 1 an. Cela peut également être lié aux stimulations mécaniques et à la lenteur de la consolidation osseuse qui remplace l'adhésif. Cette étude confirme la dégradabilité, la biocompatibilité et l'adhésion au tissu osseux du Tetranite® en l'absence de contraintes mécaniques.

Outre la fixation de fragments osseux, les adhésifs peuvent également être envisagés pour améliorer la stabilité primaire d'implants métalliques comme les implants dentaires. L'utilisation du Tetranite® pour la stabilisation primaire d'implants dentaires a été évalué *in vivo* dans un modèle d'implantation chez le chien (182). Trois implants dentaires étaient posés par hémimandibule à distance (12 semaines) de l'avulsion des deuxième, troisième et quatrième prémolaires ainsi que de la première molaire, dans des sites de forage surdimensionnés. Sur ces trois implants, l'un était implanté sans matériel adjoint (contrôle), l'autre implanté avec mise en place de xénogreffe et le dernier implanté en association avec le Tetranite®. Une vis de couverture était insérée et la muqueuse refermée. Les implants n'étaient pas mis en charge. La stabilité de l'implant était évaluée par un essai de couple inverse (mesure du couple en dévissant). Les implants posés avec le Tetranite® présentaient une tenue mécanique significativement supérieure à 1 et 10 jours par rapport aux deux autres groupes (182). Cette différence en faveur du Tetranite® n'était plus significative à 4 mois. L'analyse histologique met en évidence une dégradation de l'adhésif et son remplacement par du tissu osseux (64% d'adhésif, 34% de tissus mous et 3% d'os à 10 jours *versus* 34% d'adhésif, 27% de tissus mous et 39% d'os à 4 mois dans le groupe Tetranite®), ainsi que le maintien de l'os créal (182). L'adhésif permet donc une stabilité primaire supérieure et sa dégradation n'entraîne pas de perte de stabilité. Une mise en charge précoce des implants permettrait d'évaluer si ce gain en stabilité primaire est suffisant pour supporter les charges mécaniques et donc accélérer la prise en charge. En effet, les résultats à plus long terme ne montrent pas de gain quant à l'ajout de l'adhésif.

L'adhésion n'est pas le seul critère à évaluer dans un adhésif, la résistance en compression de l'adhésif lui-même est également importante à étudier puisqu'elle permet d'évaluer la cohésion de l'adhésif lui-même. La résistance en compression du Tetranite® a été mesurée à  $35 \pm 7$  MPa (16). Cette mesure permet d'évaluer l'effet de modifications de la formulation sur la cohésion. Par exemple, une modification de la formulation par l'ajout de sel (chlorure de sodium) a été étudiée afin d'augmenter la porosité et donc d'obtenir une éventuelle colonisation plus rapide de l'implant par de l'os (15,183). Cela diminue toutefois de façon importante la résistance en compression, qui descend jusqu'à environ 10 MPa après l'ajout de 30% de NaCl (16). Cette modification a donc été abandonnée. D'autre part, la

formulation peut être modifiée pour augmenter la cohésion de l'adhésif. En effet, l'absence de ductilité du Tetranite® est intrinsèque à sa partie minérale en CPC entraîne une fragilité vis-à-vis de certaines contraintes. L'augmentation de la cohésion permettrait une meilleure résistance mécanique de l'adhésif lui-même. L'ajout de volumateurs a ainsi été étudiée afin d'augmenter la résistance en compression de l'adhésif et de créer des pores après dégradation du volumateur pour accélérer l'ostéointégration (40). L'ajout de trois volumateurs dans l'adhésif ont été comparés par des tests en compression (mesure de la résistance en compression) contre l'adhésif sans ajout ( $39 \pm 7$  MPa) : l'ajout de 14%<sub>vol</sub> de fibres de poly(acide lactique-co-glycolique) ou PLGA ( $67 \pm 14$  MPa), l'ajout de 10%<sub>wf</sub> de chitosan lactate ( $69 \pm 19$  MPa), l'ajout de 7%<sub>vol</sub> de sutures de PLGA de 10 mm ( $55 \pm 5$  MPa). Ces volumateurs sont donc efficaces puisqu'ils augmentent donc la résistance en compression de l'adhésif. Un test de fatigue a ensuite été réalisé qui a confirmé cette efficacité : l'adhésif seul résiste à  $1.10^6$  cycles de 10 MPa dans l'eau alors que l'ajout de fibres de PLGA ou de lactate de chitosan permet d'augmenter cette résistance à 20 MPa et l'ajout de suture de PLGA à 15 MPa. Des tests en cisaillement avec du titane à la surface polie, dont la méthodologie est identique à ceux réalisés dans la première étude, ont démontré une baisse de l'adhésion dans les formulations avec volumateur : l'adhésif sans volumateur présentait une rupture de l'adhésion de type mixte à  $3,9 \pm 2,4$  MPa tandis que l'ajout de fibres de PLGA diminuait celle-ci à  $1,8 \pm 0,8$  MPa (en conservant le mode de rupture mixte adhésif et cohésif) et celui de lactate de chitosan la diminuait à 3 MPa environ avec un profil strictement adhésif. A l'inverse, les tests en cisaillement avec du titane à larges pores démontrait une adhésion supérieure de l'adhésif combiné aux fibres de PLGA ( $5,1 \pm 0,8$  MPa) par rapport à l'adhésif sans volumateur (environ 2,5 MPa) ou l'adhésif avec lactate de chitosan (environ 2,5 MPa).

L'adhésif associé avec des fibres de PLGA était alors retenu en raison de ses propriétés de cohésion, augmentant la résistance en compression malgré la baisse de l'adhésion en cisaillement. Une étude *in vivo* a ensuite été réalisée pour évaluer cette formulation. Elle consistait en une ostéotomie du condyle fémoral chez le lapin avec une fixation par transvissage (groupe contrôle) ou par transvissage associé à de l'adhésif (groupe test) dans le but d'évaluer la cicatrisation osseuse (40). Il a été retrouvé une formation de tissu osseux chez tous les animaux à l'analyse histologique. Une analyse biomécanique avec test en cisaillement, après ablation des vis, a également été menée et a mis en évidence une tenue mécanique supérieure dans le groupe adhésif le premier jour et une tenue mécanique identique à 6 semaines avec une rupture cohésive (40). Ces résultats sont similaires à l'étude d'implantation chez le chien avec une tenue primaire plus élevée dans les groupes traités avec adhésif mais un résultat à plus long terme (délai de consolidation) identique aux groupes contrôles. Ces études permettent donc de démontrer des propriétés adhésives initiales

supérieures en l'absence de contraintes mécaniques (implant non mis en charge et transvissage associé).

Au total, il a été jusqu'ici démontré que le Tetranite® était biocompatible, biodégradable et qu'il promouvait la formation de tissu osseux. Ses propriétés adhésives vis-à-vis du tissu osseux sont confirmées et semblent permettre d'augmenter la stabilité primaire d'implants dentaires. Les propriétés adhésives du Tetranite® pour la fixation osseuse en zone de contrainte mécanique n'a toutefois pas été évaluée. De plus, l'amélioration des propriétés mécaniques de l'adhésif lui-même n'est pas encore résolue.

#### 2.4.3.2.8.2 Adhésif organo-minéral composé d'OPS et d' $\alpha$ TCP (OsStic™)

L'OsStic™ est développé par une équipe de recherche suédoise dont la première publication à son sujet date de 2018 (17). C'est aussi un adhésif organo-minéral composé cette fois-ci d'OPS, d' $\alpha$ TCP (et non de TTCP) et de métasilicate de calcium. La recherche de la formulation optimale était basée sur la mesure de l'adhésion, de la résistance en compression et du temps de prise d'adhésifs à base d'OPS et d' $\alpha$ TCP de différentes formulations et de différents ratio liquide/poudre. La formulation comprenant 30%<sub>mol</sub> d'OPS avec un ratio liquide/poudre de 0,25 mL/g était retenue comme optimale avec une adhésion en cisaillement de 1,8 MPa et une résistance en compression de l'adhésif à environ 50 MPa. L'évaluation de l'adhésion était évaluée avec des échantillons en os cortical bovin en traction uniaxiale (traction par un poids de 4 kg correspondant à 0,4 MPa) et en cisaillement avec un collage bout-à-bout (par mesure instrumentale à l'extensomètre) (17). La disposition bout-à-bout est toutefois normalement utilisée pour un test en traction uniaxiale et non pour le cisaillement (70,36). Le non-respect des normes entraîne des difficultés pour comparer les études entre elles.

Des tests mécaniques en cisaillement similaires étaient ensuite réalisés pour évaluer différents facteurs pouvant influencer sur l'adhésion : le contenu en acides aminés, la façon de mélanger les composants, l'épaisseur du joint, la composition du milieu (entre humide, aqueux et salin), le temps et la force de compression des échantillons (184). Seuls l'épaisseur du joint et le contenu en acides aminés (donc le pourcentage molaire d'OPS) ont un impact sur l'adhésion.

Des essais mécaniques *ex vivo* ont aussi été menés. Ils se rapprochent d'une utilisation clinique : la stabilisation primaire d'implant métalliques pour le premier modèle (185) et la fixation d'autogreffes pour le deuxième modèle (37,186). Le premier modèle *ex vivo* consistait en l'extraction de vis en aluminium implantées dans des têtes fémorales humaines (185). Trois

groupes étaient définis : insertion de vis isolée, insertion de vis associée à du ciment phosphocalcique (dicalcium phosphate dihydrate) ou insertion de vis associée à l'adhésif  $\alpha$ TCP/OPS. L'extraction était réalisée 24 heures après l'insertion. L'adhésion des vis dans le groupe avec adhésif était significativement supérieure aux autres groupes.

Le deuxième modèle *ex vivo* consistait en l'extraction d'un bouchon d'os (le bouchon d'os était prélevé puis ré-implanté et fixé dans la zone de prélèvement) implanté dans des fémurs de rats (37) ou d'humains (186). Deux groupes étaient définis : fixation par adhésif  $\alpha$ TCP/OPS (avec métasilicate dans l'essai sur os humain) ou par colle de fibrine. L'extraction était réalisée à 4 heures dans l'étude sur l'os de rat et à 2 et 24 heures dans l'étude sur l'os humain. L'adhésion était significativement et très largement supérieure dans le groupe avec OsStic™ par rapport au groupe avec colle de fibrine dans ces deux études (37,186). La colle de fibrine n'est toutefois pas utilisée cliniquement comme un adhésif mais comme un hémostatique ou un produit de scellement (187), elle n'est donc pas adaptée comme groupe contrôle positif. Ce modèle a été transposé dans un modèle *in vivo* avec extraction d'un bouchon d'os implanté dans le fémur du rat (22). L'adhésion était démontrée comme significativement supérieure dans le groupe avec OsStic™ à 4 heures et 3 jours. Toutefois, dès 7 jours, l'adhésion était retrouvée supérieure dans le groupe colle de fibrine, l'adhésif présentant de très faibles propriétés adhésives. La perte de substance comblée par l'autogreffe lui correspond parfaitement avec notamment de bons contacts osseux et sans exposition aux mouvements musculaires. En l'absence de contraintes mécaniques, la consolidation peut être obtenue sans moyen de fixation. Les résultats initiaux corroborent les résultats *ex vivo* : la stabilité primaire est augmentée, toutefois, dès 7 jours, la fixation par un adhésif faible (colle de fibrine) permet d'obtenir plus de tenue mécanique que l'utilisation de l'OsStic™, un adhésif puissant.

La cytocompatibilité de l'OsStic™ a été démontrée *in vitro* en contact direct avec des ostéoblastes et des odontoblastes et en contact indirect avec des fibroblastes (188). La biocompatibilité de l'OsStic™ a été démontrée *in vivo* dans un modèle d'implantation sous-cutanée chez le rat (20). Aucune réaction immunitaire n'était retrouvée à 6 ou 12 semaines, ni aucune formation d'os ectopique (20).

En résumé, l'OsStic™ est donc biocompatible, ses propriétés adhésives vis-à-vis du tissu osseux sont démontrées, permettant d'augmenter la stabilité primaire d'implant métalliques. Toutefois, comme dans le cas du Tetranite®, l'OsStic™ n'a toutefois pas été évalué pour la fixation osseuse en zone de contrainte mécanique. De plus, les propriétés mécaniques de l'adhésif lui-même doivent encore être améliorées.

### 2.4.3.3 Conception de notre adhésif

Comme démontré précédemment, l'association d'OPS et d'un ciment phospho-calcique permet de créer un adhésif organo-minéral avec une forte capacité d'adhésion vis-à-vis du tissu osseux. Le TTCP en particulier compose plusieurs ciments phospho-calciques à prise spontanée commercialisés actuellement. Il s'agit maintenant de poursuivre le développement d'adhésifs organo-minéraux en optimisant leurs propriétés adhésives mais aussi en leur apportant de nouvelles fonctionnalités. Dans cet objectif, les nanoparticules de polydopamine, compte tenu de leurs propriétés d'adhésion, d'ostéoinduction et leur biocompatibilité constituent des candidates idéales.

En effet, la dopamine (Figure 1A) est une molécule biologique appartenant à la famille des catécholamines. Chez l'humain, on la retrouve au sein du système nerveux où elle sert de neurotransmetteur. Son précurseur direct est le 3,4-dihydroxyphénylalanine ou DOPA (Figure 1B). Cette dernière est présente dans les *mussel foot proteins* et dans la colle du ver *Phragmatopoma californica* où elle joue un rôle majeur dans les capacités d'adhésion de ces organismes vivants. La DOPA nécessite toutefois un contrôle du fin du pH et des réactions oxydatives pour exprimer ces propriétés adhésives (151,154).

La dopamine peut être polymérisée en polydopamine (PDA) (Figure 1C) (189). La synthèse de PDA en solution nécessite simplement d'exposer à l'air une solution de dopamine en condition basique (tampon Tris avec un pH à 8,5) (24). Ainsi, divers matériaux (métaux, céramiques, polymères, etc.) peuvent être recouverts de PDA par simple immersion dans une solution de dopamine en condition basique (24,25). Grâce à sa réactivité latente envers les nucléophiles, la PDA est considérée comme une plateforme universelle pour la biofonctionnalisation. Diverses applications biomédicales ont alors été envisagées pour ces matériaux recouvert de PDA : interface avec les cellules, distribution médicamenteuse, biodétection, etc (190). De plus, la PDA promeut la minéralisation (26), la prolifération ostéoblastique et l'ostéointégration de substituts osseux (27). Le revêtement par de la PDA d'un CPC a ainsi permis d'améliorer l'adhésion et la prolifération de cellules souches de moelle osseuse (28) et de promouvoir une minéralisation rapide (29). Dans une étude *in vivo*, le ciment phospho-calcique recouvert de PDA a stimulé la formation de tissu osseux et amélioré l'adhésion au tissu osseux (30). L'utilisation de PDA sous forme de nanoparticules (nPDA) permettrait d'améliorer les propriétés d'adhésion de l'adhésif organo-minéral et d'introduire de nouvelles fonctionnalités.

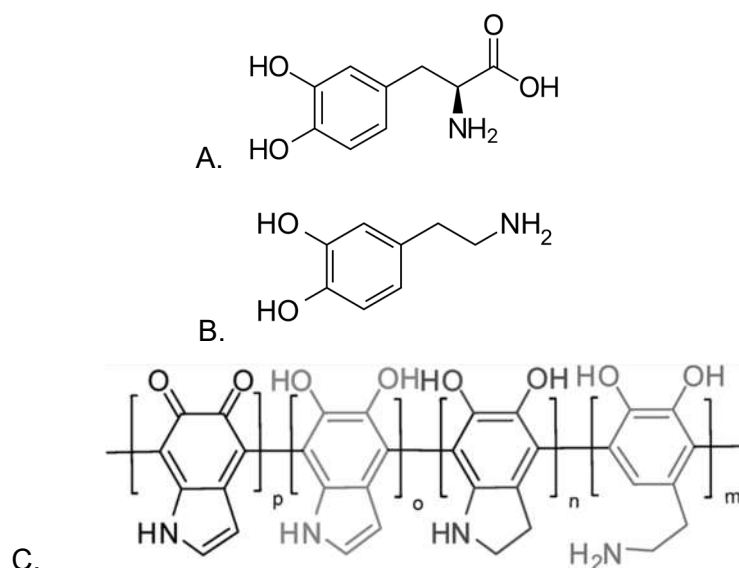


Figure 1 : Structure chimique de la DOPA (A.), de la dopamine (B.) et de la polydopamine (C.). La structure de la polydopamine est ré-imprimée avec autorisation, elle provient de l'article « Liebscher *et al.*, Structure of Polydopamine: a never ending story?, *Langmuir* 2013, 29, 10539-10548 », copyright 2013 American Chemical Society

Les nPDA sont également formées par auto-polymérisation de dopamine en solution basique (ajout d'hydroxyde de sodium) exposées à l'air, elles sont ensuite récupérées par centrifugation ou dialyse. Elles présentent des capacités adhésives intrinsèques et une excellente affinité pour les protéines (31). De façon similaire à la PDA, elles adhèrent lors d'une simple immersion à des substrats variés (céramiques, métaux, polymères, *etc.*) (31–33). Elles sont ostéo-inductives et génèrent un microenvironnement adapté à l'adhésion et la prolifération cellulaire promouvant la régénération tissulaire et notamment la formation de tissu osseux (31). Leur biocompatibilité ainsi que leur biodégradabilité sont bien documentées (30,34,35).

Les nPDA, grâce à leurs propriétés adhésives et ostéo-inductives, peuvent ainsi être considérées comme des candidates idéales pour poursuivre l'amélioration de performance globale des adhésifs osseux biomimétiques organo-minéraux et leur communiquer de nouvelles fonctionnalités. Dans ce travail, le TTCP, l'OPS et les nPDA seront combinées ensemble pour élaborer un adhésif osseux présentant des propriétés adhésives optimisées ainsi qu'offrir la possibilité de charger des agents bioactifs.

#### 2.4.4 Les méthodes d'évaluation des adhésifs osseux

L'évaluation d'un adhésif osseux comprend tout d'abord, de façon similaire à n'importe quel adhésif, une évaluation des propriétés mécaniques : évaluation de l'adhésion (test en

traction) mais aussi évaluation de la cohésion (test en compression) et du temps de prise (lien étroit avec le temps de travail). Cette évaluation pour un adhésif osseux doit toutefois être adaptée aux particularités du tissu osseux qui est un tissu biologique non standardisé. De plus, l'utilisation dans des organismes vivants requière des matériaux stérilisés dont les propriétés ne doivent pas être altérées par la méthode de stérilisation utilisée. Il convient également de s'assurer de la biocompatibilité de l'adhésif et de ses composants ainsi que d'évaluer les propriétés adhésives en condition d'application *in vivo*.

Les différentes méthodes utilisées dans la littérature récente pour l'évaluation des adhésifs osseux sont discutées ci-dessous.

#### 2.4.4.1 Évaluation mécanique de l'adhésion

Afin d'évaluer un adhésif, il s'agit d'abord de définir ses capacités d'adhésion en mettant en tension la zone collée jusqu'à rupture. Les différents tests mécaniques évaluant l'adhésion étaient présentés dans la section 2.3 : traction uniaxiale, cisaillement, flexion, fatigue, pelage, clivage, impact et fluage. Des normes pour chacun de ces tests sont édités par l'ASTM International (anciennement American Society for Testing and Materials). Toutefois, l'os étant un tissu biologique, il est extrêmement difficile de fabriquer les échantillons standardisés nécessaires pour respecter ces recommandations. À ce sujet, Bou-Francis & Ghanem (36) ont publiés une méthode standardisée de tests en traction uniaxiale et en cisaillement adaptées au tissu osseux. Les objectifs de ces tests sont de quantifier l'adhésion (force nécessaire pour obtenir une rupture) et de connaître le mode de rupture (adhésive, cohésive ou mixte).

Les tests utilisés dans la littérature récente au sujet des adhésifs osseux sont les suivants :

- *Traction uniaxiale*. La plupart des études (112,113,132,146,147,191) réalisent ce test avec deux échantillon collés bout-à-bout et une mesure sur extensomètre suivant un montage similaire à celui proposé par Bou-Francis & Ghanem (36). Une seule étude (17) utilise une méthode alternative avec une mise en tension par un poids fixe de 4 kg (correspondant à 0,4 MPa) appliqué sur un échantillon osseux collé à un autre. Cette méthode ne peut être utilisée que pour le criblage d'une formulation puisqu'elle ne permet que de définir si l'adhésion est supérieure ou inférieure à ce seuil.
- *Cisaillement*. Deux méthodes en cisaillement sont utilisées pour évaluer deux échantillons collés avec une mesure sur extensomètre. La première méthode (113,132,147,149) correspond à un montage similaire à celui proposé par Bou-

Francis & Ghanem (36). La seconde méthode correspond à un collage bout-à-bout des échantillons (16,17,40,184). La disposition bout-à-bout est toutefois normalement utilisée pour un test en traction uniaxiale et non pour le cisaillement (70,36). Une dernière méthode est utilisée mais celle-ci n'évalue pas le collage de deux échantillons entre eux, la force est directement appliquée sur l'adhésif qui est disposé sur un échantillon (115,134). Cette méthode nécessite l'application d'une importante quantité d'adhésif, très éloignée des quantités appliquées lors d'une utilisation clinique. Elle constitue une évaluation mixte de l'adhésion mais aussi de la cohésion.

- *Flexion*. La flexion 3 points est utilisée dans une seule étude pour un test d'adhésion *in vitro* de deux échantillons collés bout-à-bout (133). Elle est utilisée pour l'évaluation biomécanique après explantation de fémurs (133) ou de tibias (192) de rat fracturés. La difficulté de l'utilisation de la flexion 3 points est la disposition d'un os qui présente de nombreuses courbures contrairement à un échantillon usiné. La répartition des forces ne peut donc être aussi précise et reproductible. Une autre méthode en flexion a également été utilisée mais cette fois en porte-à-faux dans un modèle *ex vivo* d'ostéotomie de mandibule du chien (180). La mandibule était fixée du côté proximal à un plan dur et la contrainte était appliquée au niveau distal. Cette étude a l'avantage d'approcher une utilisation clinique avec une disposition correspondant à l'ouverture buccale. En effet les muscles élévateurs s'insèrent sur l'angle et la branche montante mandibulaire tandis que les muscles abaisseurs s'insèrent au niveau de la symphyse. La contrainte appliquée correspond donc à celle des muscles abaisseurs sur une mandibule fracturée.
- *Fatigue*. Une étude utilise un test de fatigue, toutefois en compression sur un échantillon de colle et non sur un joint adhésif (40). L'adhésion n'est donc pas évaluée.
- *Clivage*. Une étude applique un test de clivage (147). Ce test permet d'évaluer la dureté de rupture de l'adhésif. Il est difficile à mettre en œuvre (réalisation des échantillons, méthode d'évaluation) ce qui explique sa faible utilisation.
- *Pelage*. Le tissu osseux étant dur, l'adhésion de deux échantillons ne peut être évaluée par pelage. Toutefois, si l'adhésif lui-même est souple, un pelage de l'adhésif collé sur une surface osseuse peut être réalisé. Cette méthode est utilisée dans un modèle *in vivo* pour évaluer l'adhésion après implantation de l'adhésif sur des fémurs de rat (133).
- *Impact et fluage*. Ces tests n'ont pas encore été réalisés dans l'étude des adhésifs osseux.

- **Contraintes complexes.** Les contraintes simples permettent une comparaison plus aisée toutefois elles sont éloignées d'une utilisation en condition réelle ou plusieurs contraintes mécaniques s'imposent au joint adhésif. Lors d'évaluation dans des modèles *ex vivo* cherchant à s'approcher de l'utilisation clinique ou d'évaluation biomécanique d'échantillons issus d'un modèle *in vivo*, il n'est pas possible de réaliser un test avec une contrainte simple. C'est le cas par exemple du modèle du bouchon osseux : un bouchon osseux est prélevé puis ré-implanté et collé dans la perte de substance correspondante (22,37,186). La traction de ce bouchon entraîne des contraintes en traction et en cisaillement. Il en est de même avec les modèles d'extraction de vis (185), de poussée de volet crânien (39) ou de greffe fémorale (30) ou de couplage inverse d'implants dentaires (182).

L'utilisation de tests avec des contraintes et des applications de ces contraintes variées rend la comparaison entre les études difficile. Cela est accentué par la variabilité des autres paramètres : nature de l'échantillon, état de la surface, conditions environnementales entre le collage et le test mécanique, durée entre le collage et le test mécanique. La totalité des paramètres n'étant de plus pas toujours explicités dans les différentes publications. En effet, si l'os est principalement utilisé pour évaluer l'adhésif osseux, d'autres matériaux peuvent également être utilisés en parallèle à titre comparatif (métaux (16,17,40,184,185), matériaux alloplastiques comme le PEEK ou l'acide polylactique (16), ciment phospho-calciques (16)) ou en remplacement de l'os (utilisation d'échantillons acryliques (132)). Certains de ces matériaux sont des composants d'implants, notamment les métaux (implants dentaires ou prothèses articulaires) et le PEEK (comblement de perte de substance osseuse cranio-faciale). Les échantillons osseux peuvent être corticaux, cortico-trabéculaires ou trabéculaires, ils sont issus de squelettes bovins (17,113,115,132,146,147,184,191), porcins (16,40,133,134,149), murins (22,37,133), canins (180,182), ovins (39,112) ou humains (185,186). Les surfaces de ces échantillons sont plus ou moins finement polies, voire à l'inverse, elles peuvent présenter des irrégularités à dessein.

L'environnement des échantillons entre le collage et le test mécanique *in vitro* est le plus souvent une simulation des conditions physiologique avec une immersion dans un milieu aqueux et une température de 37°C. Toutefois, certaines études évaluent uniquement les échantillons en condition ambiante (112,132,133,146), ou se contentent d'un tissu humide pour simuler l'environnement aqueux (112,132–134). Ces conditions sont très éloignées des conditions physiologiques, il est donc difficile de transposer les résultats alors obtenus à une utilisation ultérieure en milieu biologique.

Finalement, le test mécanique peut être réalisé après différents laps de temps suivant le collage : toutes les 5 minutes jusque 45 minutes (149), à 1 heure (37,147), à 2 heures

(132,186), à 6 heures (147), à 24 heures (17,112,115,132,146,147,180,184–186,191), à 48 heures (16,40), ou encore à 7 jours (115). La plupart des études varient les durées d'analyse pour évaluer l'évolution de l'adhésion.

Les tests mécaniques évaluant l'adhésion au tissu osseux décrits dans la littérature sont donc variés, engendrant des comparaisons difficiles entre eux. Le respect des conditions physiologiques (milieu aqueux et température à 37°C) semble consensuel. L'utilisation de plusieurs méthodes permet de mieux étayer les résultats. La plupart des tests sont réalisés en conditions de laboratoires, mais certains cherchent à développer des tests mécaniques *ex vivo* se rapprochant d'une application clinique, comme par exemple le modèle de fixation de mandibule de chien de Geddes *et al.* (180), imitant les contraintes appliquées sur une fracture de mandibule.

Dans ce travail, l'adhésion sera évaluée en traction uniaxiale selon une méthode similaire à celle proposée par Bou-Francis & Ghanem (36) sur des échantillons collés bout-à-bout. Ces échantillons seront métalliques (titane) et osseux (os cortical bovin). Des conditions similaires aux conditions physiologiques (milieu aqueux et température à 37°C) seront respectées. L'évaluation se fera à deux échéances : 1 heure et 24 heures. De plus, un modèle *ex vivo* mimant la fixation de greffe osseuse a été développé.

#### 2.4.4.2 Évaluation mécanique en compression

L'évaluation en compression est également nécessaire pour caractériser l'adhésif. Elle permet d'évaluer la cohésion et donc les liens intermoléculaires existant au sein de l'adhésif lui-même. La cohésion de l'adhésif est importante puisque les sollicitations mécaniques passeront par le joint adhésif tant que la consolidation n'est pas obtenue.

Cette évaluation est réalisée sur des échantillons d'adhésif générés dans des moules faits sur mesure dans chaque étude. Le respect des conditions physiologiques (milieu aqueux et température à 37°C) est majoritairement respecté à l'exception d'une étude chauffant l'adhésif à 60°C durant 1 heure avant le test (112). Toutefois, les délais entre la fabrication de l'échantillon et l'évaluation mécanique sont à nouveau variables : 1 heure (112), 24 heures (17,184) et 48 heures (16,40).

Le test de fatigue en compression n'est réalisé que dans une seule étude (40) : la résistance de l'adhésif à 1 million de cycles de compression à une force donnée est évaluée. Ce test donne donc des informations sur le comportement de l'adhésif lorsqu'il est soumis à des sollicitations mécaniques itératives. Son utilisation limitée semble liée à la difficulté de mise en œuvre.

Dans ce travail, l'évaluation de la compression sera réalisée de façon instrumentale sur des échantillons cylindriques d'adhésif fabriqués 24 heures au préalable et conservés en conditions physiologiques.

#### 2.4.4.3 Évaluation du temps de prise

Le temps de prise d'un adhésif est une donnée importante (193) : s'il est trop court, il ne permettra pas de positionner les éléments à coller de façon satisfaisante. À l'inverse, s'il est trop long, il deviendra difficile de maintenir la position des éléments à coller. De plus, son utilisation sera alors évitée au profit d'alternatives (les implants métalliques) plus rapides et économiques en temps d'anesthésie comme en coût.

L'évaluation du temps de prise d'un ciment conventionnel est régie par la norme ASTM C266-18. La mesure est basée sur le principe du dispositif de Gillmore qui différencie entre la prise initiale, déterminée à l'aide d'une aiguille de 2,12 mm de diamètre appliquée avec une force de 113,4 g, et la prise finale, déterminée à l'aide d'une aiguille de 1,06 mm appliquée avec une force de 453,6 g. Ce dispositif n'est utilisé que dans une seule étude pour caractériser le temps de prise de la colle et aider au criblage de la formulation idéale (17). Il est d'ailleurs souligné dans une autre étude l'absence de méthode validée pour mesurer le temps de prise d'un adhésif organo-minéral (184).

Dans cette thèse, l'évaluation du temps de prise sera réalisée avec des aiguilles commercialisées respectant les diamètres de celles du dispositif de Gillmore. La pression manuelle sera appliquée après un entraînement pour rester au plus proche de la force requise par le dispositif de Gillmore.

#### 2.4.4.4 Stérilisation de l'adhésif osseux

La stérilisation est une opération permettant d'éliminer les micro-organismes (bactéries, virus, champignons, levures, agents transmissibles non conventionnels) portés par des supports inertes. Elle est absolument nécessaire pour tout matériau implantable afin d'éviter des infections de site opératoire qui peuvent avoir de lourdes conséquences. Selon la norme EN 556, pour qu'un dispositif médical ayant subi une stérilisation puisse être étiqueté stérile, la probabilité qu'un micro-organisme viable soit présent sur un dispositif doit être égale ou inférieure à  $1/10^6$ . Plusieurs méthodes de stérilisation existent, il convient de choisir la plus adaptée au matériau à stériliser en respectant sa tolérance à la chaleur, à l'humidité, aux produits chimiques, etc. Malheureusement, la notion de stérilisation n'est souvent pas évoquée dans les publications au sujet des adhésifs, même quand un essai *in vivo* avec implantation

est décrit. Par exemple, Bai *et al.* (149) précise que l'adhésif, constitué d'acide tannique et fibroïne de soie, est stérilisé mais sans citer la méthode utilisée.

Parmi les études mentionnant les méthodes de stérilisation, deux études utilisent le rayonnement ultraviolet ou l'exposition au propanolol pour stériliser un adhésif en polymère fonctionnalisé par réaction thiol-ène dans l'une (133) et un adhésif organo-minéral dans l'autre (164). Toutefois ces méthodes ne sont pas autorisées pour une application clinique (194). Elles ne permettent donc pas d'atteindre l'objectif d'une transposition vers une utilisation *in vivo*.

La vapeur d'eau sous pression est la plus utilisée des méthodes de stérilisation (194). Elle est utilisée pour stériliser une colle composée de chitosan, de glycérol et/ou de glutaraldéhyde (191) utilisée dans un essai *in vitro*. Toutefois, elle ne convient pas aux CPC, qui sont très sensibles à l'humidité.

Après la vapeur d'eau, l'oxyde d'éthylène (OE) est une méthode fréquemment utilisée en raison de propriétés inverses à la vapeur d'eau : l'OE permet de stériliser les matériaux sensible à la température et à l'humidité (194). Son défaut est sa toxicité et le risque d'absorption par le matériau (194). Il convient de respecter un long délai de dégazement avant d'utiliser le matériel stérilisé. L'OE a déjà été utilisée pour stériliser des CPC dans le cadre de la recherche (195).

L'irradiation aux rayons  $\gamma$  est utilisée dans trois études évaluant respectivement un adhésif organo-minéral (20), un ciment phospho-calcique associé à de la polydopamine (30) et du poly(butyle fumarate)/poly(propylène fumarate) réticulé avec du diacrylate et associé à de la nanopoudre d'hydroxyapatite (113). L'irradiation aux rayons  $\gamma$  est aussi la méthode la plus utilisée pour la stérilisation des CPC (196).

Dans ce travail, la stérilisation à l'OE sera comparée à la stérilisation par irradiation  $\gamma$ .

#### 2.4.4.5 Évaluation biologique

En parallèle de la caractérisation mécanique, il convient d'évaluer la réponse des tissus biologiques à l'adhésif. Une évaluation préliminaire *in vitro* de la cytotoxicité suivant la norme ISO10993-5 est un prérequis avant une évaluation *in vivo*. Toutefois, les ciments phospho-calciques avec prise *in situ* sont connus pour présenter une cytotoxicité *in vitro* mais une bonne compatibilité *in vivo* en raison de la forte quantité d'ions relargués ainsi que des modifications de pH du milieu de la culture cellulaire statique. De plus, l'OPS présente une acidité qui est également responsable de mort cellulaires en condition de culture cellulaire statique. Ces éléments peuvent être évités *in vitro* par pré-conditionnement du matériau à tester ou neutralisation préalable du milieu de culture, de façon similaire à ce que l'organisme réalise *in*

*vivo*, permettant ainsi une évaluation *in vitro* de la cytocompatibilité des adhésifs organominéraux proche des conditions *in vivo* (188).

L'évaluation *in vivo* permet ensuite de confirmer ou non la biocompatibilité de l'adhésif, un élément primordial pour tout matériau visant une utilisation clinique. De plus, l'évaluation *in vivo* pourra également évaluer si les propriétés adhésives mesurées *in vitro* se modifient lors d'une utilisation intracorporelle de l'adhésif. Divers modèles animaux peuvent être utilisés dans ce domaine : le lapin, le rat, le chien ou encore le mouton. Dans leur revue systématique des modèles animaux utilisés pour l'étude des adhésifs osseux, Van Erk *et al.* (38) notent que le lapin est l'espèce la plus utilisée pour évaluer les adhésifs osseux, suivi du rat (38). Par ailleurs, le rat est l'animal le plus étudié dans les modèles de réparation osseuse en général (197), ses processus de consolidation osseuse sont bien connus et suffisamment proche de l'humain pour pouvoir exploiter les résultats (198). Sa petite taille pourrait être la raison principale de la préférence pour le lapin.

Il est ensuite retrouvé une prédominance des modèles travaillant sur les os longs par rapport au reste du squelette (38). Van Erk *et al.* (38) répartissaient les modèles animaux évaluant les adhésifs osseux en quatre catégories : fracture complète, fracture partielle, comblement de perte de substance, perforations corticales (en association avec une autogreffe osseuse). Les modèles d'implantation sans geste osseux évaluant la biocompatibilité ne sont donc pas pris en compte.

Les modèles correspondant à la fixation d'une greffe osseuse, soit les modèles de comblement d'une perte de substance ou les modèles de perforation corticale, sont les plus fréquemment utilisés pour évaluer un adhésif (38). Ces modèles évaluent de façon très variable les propriétés adhésives en fonction des contraintes mécaniques appliquées. En effet, un modèle d'apposition sur la corticale d'un os est sujet à des contraintes supérieures à un modèle de greffe implanté dans une perte de substance de taille correspondante. De façon similaire, un modèle de greffe implantée au niveau du fémur ou du tibia est sujet à des contraintes très supérieures à un modèle de greffe implanté au niveau crânien.

Afin de prendre en compte tous les types de modèles animaux d'évaluation *in vivo* des adhésifs osseux, même ceux évaluant uniquement la biocompatibilité, les modèles ont été classifiés en sept types. Tous les modèles comprennent une implantation intracorporelle de l'adhésif et donc une évaluation de la biocompatibilité.

#### 2.4.4.5.1 Modèles animaux d'implantation sous-cutanée de l'adhésif

L'évaluation de la biocompatibilité d'un matériau implantable nécessite une implantation intracorporelle et une évaluation de la réaction des tissus vis-à-vis de cet implant.

Les modèles animaux les plus simples à réaliser pour évaluer la biocompatibilité sont les modèles d'implantation sous-cutané du matériau à tester. Par exemple, Hulsart-Billström *et al.* (20) présentaient un modèle où six disques, constitués chacun d'un adhésif organo-minéral différent, stérilisés par irradiation  $\gamma$ , étaient implantés sous la peau dorsale de chaque rat pendant 6 ou 12 semaines (N=9 pour chaque groupe). Les disques étaient alors prélevés pour réaliser une analyse histologique de la zone d'implantation à la recherche d'une toxicité tissulaire.

Dans le modèle décrit par Bai *et al.* (149), un seul disque d'adhésif composé d'acide tannique et de fibroïne de soie était implanté au niveau sous-cutané dorsal pendant 15, 30 et 45 jours (N=3 pour chaque groupe). En plus de l'analyse histologique évaluant la réaction inflammatoire et l'absence d'histotoxicité, les implants étaient pesés pour évaluer la dégradation du matériau par perte de masse.

Évidemment, les modèles d'implantation sous-cutanés ne correspondent évidemment pas à l'utilisation clinique d'un adhésif osseux et ne constituent donc que des résultats préliminaires de sécurité biologique et d'évaluation de la dégradation au sein des tissus mous.

#### 2.4.4.5.2 Modèles animaux d'implantation de l'adhésif en apposition sur l'os

L'alternative à l'implantation en sous-cutanée pour évaluer la biocompatibilité hétérotopique est l'application de l'adhésif en apposition sur un os. La biocompatibilité est alors évaluée orthotopiquement dans un milieu proche de l'utilisation future. Par exemple, Winslow *et al.* (169) présentaient un modèle dans lequel l'adhésif en copolymère de phosphate et dopamine était appliqué directement sur le crâne de rats pendant 2 ou 4 semaines (N=6 pour chaque groupe). La zone implantée était alors prélevée pour réaliser une analyse histologique de la zone d'implantation à la recherche d'une toxicité tissulaire.

Dans le modèle décrit par Granskog *et al.* (133), l'adhésif en polymère fonctionnalisé par réaction thiol-ène était unilatéralement appliqué directement sur le fémur de 16 rats. Cinq semaines suivant l'implantation, une analyse histologique était réalisée pour évaluer la réaction tissulaire locale (N=3), tandis qu'une évaluation mécanique par un test de pelage était réalisée sur les autres échantillons (N=13). Ce modèle permet d'évaluer l'adhésion au tissu osseux au terme du délai de consolidation osseuse chez le rat (197,199).

Même si ce modèle a des avantages par rapport à celui d'implantation sous-cutanée, l'évaluation reste toutefois strictement limitée à l'adhésion de l'adhésif à l'os et non pas à un collage entre deux os, ce qui est l'objectif principal lorsqu'un adhésif est utilisé.

#### 2.4.4.5.3 Modèles animaux de comblement de perte de substance de taille critique (*critical size defect*)

Ces modèles sont principalement utilisés pour évaluer l'ostéointégration, la résorption et le remodelage des substituts osseux dans un contexte de reconstruction et de régénération tissulaire osseuse. Ils n'évaluent donc pas les propriétés adhésives.

Par exemple, Liu *et al.* (30) décrivaient un modèle dans lequel l'adhésif était implanté en tant que substitut osseux pour combler 12 pertes de substances crâniennes bicorticales circulaires de 8 mm de diamètre et 6 pertes de substances fémorales circulaires de 5 mm de diamètre et 4 mm de profondeur chez 18 lapins. L'adhésif implanté était soit un ciment phospho-calcique, soit un ciment phospho-calcique associé à de la PDA (N=6 au niveau du crâne, N=3 au niveau du fémur pour chaque groupe respectivement). Au sein de chaque groupe, les animaux étaient sacrifiés à 2, 4 et 8 semaines. Les zones implantées étaient alors prélevées et analysées histologiquement à la recherche d'une histotoxicité. Une analyse histomorphométrique quantifiait la formation de tissu osseux et évalue la résorption de l'adhésif. De façon similaire, Kirillova *et al.* (16) décrivaient un modèle animal où l'adhésif (Tetranite®) était implanté pour combler 24 pertes de substances du condyle fémoral médial circulaires de 5 mm de diamètre et 10 mm de profondeur chez 12 lapins pendant 8, 26 et 52 semaines (N=8 implantations pour chaque groupe). Les échantillons prélevés étaient également analysés histologiquement et histomorphométriquement avec des objectifs identiques, toutefois l'intérêt réside dans une évaluation à plus long terme dans cette étude.

Dans le modèle décrit par Bai *et al.* (149), une perte de substance fémorale circulaire de 3 mm de diamètre et 3 mm de profondeur était générée chez 12 rats puis comblée soit par l'adhésif composé d'acide tannique et de fibroïne de soie, soit par des fibroïnes de soie, soit laissée vide pendant 8 semaines (N=4 par groupe). Les échantillons étaient alors uniquement analysés par microtomodensitométrie afin d'évaluer la quantité de tissu osseux présent et la résorption de l'adhésif.

Ces modèles évaluent donc la résorption et le remodelage de l'adhésif par des analyses quantitatives (histomorphométrie ou microtomodensitométrie). Ces modèles dérivent de l'évaluation des substituts osseux pour lesquels ils sont plus adaptés.

#### 2.4.4.5.4 Modèles animaux de fixation de greffe osseuse

Ces modèles cherchent à évaluer les propriétés adhésives vis-à-vis du tissu osseux ainsi que la consolidation osseuse. Les autogreffes osseuses sont considérées comme le *gold standard* de la reconstruction osseuse (54,200,201). Les greffes sont appliquées directement

sur un os qui absorbe les contraintes mécaniques lors d'une mise en charge. Les contraintes mécaniques sont donc faibles et seulement liées aux mouvements des tissus mous environnants. Dès lors qu'une contrainte, même minimale s'applique, la fixation devient nécessaire pour éviter le déplacement des greffons et obtenir leur ostéointégration (54,55). Plusieurs modèles d'autogreffes sont décrits avec une dichotomie entre les greffons placés en apposition ou pour combler une perte de substance (issue du prélèvement du greffon). Les premiers subiront les contraintes liées aux mouvements des tissus mous environnants, tandis que les seconds seront parfaitement adaptés à la perte de substance, leur imbrication assurera leur stabilité mécanique.

Esteves *et al.* (126) décrivaient un modèle d'autogreffes crâniennes en apposition : l'os pariétal droit était prélevé et greffé en apposition sur l'os pariétal gauche. Les 48 rats étaient divisés en trois groupes : fixation par deux adhésifs polycyanoacrylates étudiés différents et contrôle sans fixation. Ils étaient sacrifiés à 10 et 60 jours (N=8 rats par groupes par temps). Les échantillons étaient analysés par histologie avec histomorphométrie afin d'évaluer la biocompatibilité, la résorption et le remplacement de l'adhésif par le tissu osseux. Il est intéressant de constater la totale intégration des greffes non fixées au niveau crânien, ce qui confirme l'absence de stimulation mécanique et l'inutilité d'un moyen d'adhésion à cet endroit. Les substituts osseux peuvent tout à fait être apposés sans fixation au niveau crânien en pratique clinique humaine (52,202). Le site crânien ne semble donc pas approprié pour étudier des propriétés adhésives. De façon similaire, Hochuli-Vieira *et al.* (123) comparent trois moyens de fixation d'autogreffes crâniennes prélevées sur l'os frontal et apposées à un autre endroit sur le même os frontal de 20 lapins (l'os pariétal est mentionné dans la publication mais le schéma explicatif montre clairement l'os frontal comme site opératoire (203)). Trois autogreffes étaient fixées par chacune un moyen différent (deux adhésifs polycyanoacrylates différents ou par une vis) chez un même lapin, ceux-ci étaient sacrifiés à 7, 15, 30, 60 et 120 jours (N=4 dans chaque groupe). Une analyse histologique et histomorphométrique était alors réalisée avec les mêmes objectifs que l'étude précédente. Les modèles d'autogreffe crâniennes apposées en crâniens, en raison de l'absence de stimulation mécanique permettent donc d'évaluer la résorption et l'ostéointégration mais ne permettent pas d'évaluer l'adhésion.

De Oliveira *et al.* (124) décrivaient un modèle d'autogreffe mandibulaire : l'os était prélevé en pariétal et apposé au niveau de la face latérale de la branche horizontale de la mandibule chez 18 lapins. Les greffons étaient fixés sur la mandibule d'un côté par de l'adhésif (cyanoacrylate) et de l'autre par une vis. Les lapins étaient sacrifiés à 1 et 6 semaines (N=9 dans chaque groupe) et les échantillons analysés par tomodynamométrie et par histologie afin d'évaluer la biocompatibilité, la résorption et l'ostéointégration. Ce modèle est différent des

modèles d'autogreffes crâniennes puisque les greffons osseux apposés sur le squelette maxillo-mandibulaire subissent des contraintes mécaniques (54). L'absence de déplacement secondaire du greffon signale le succès de la fixation par adhésif. Toutefois, l'évaluation concernait uniquement le volume de la greffe et non pas sa position, l'évaluation de l'adhésion n'était pas un objectif de l'étude.

Dans les modèles de comblement de perte de substance par une autogreffe, celle-ci est remplacée précisément dans la perte de substance constituée par son prélèvement. Winslow *et al.* (169) décrivaient un modèle dans lequel un disque bicortical d'os pariétal était prélevé puis repositionné dans le site de prélèvement, sans fixation (N=4) ou avec fixation par l'adhésif en copolymère de phosphodopa (N=8) chez le rat. Les animaux étaient sacrifiés à 4 et 12 semaines. Ensuite, seule une analyse histologique était réalisée pour évaluer l'histotoxicité et de façon qualitative la résorption de l'adhésif et la formation de tissu osseux. Foley *et al.* (39) décrivent un modèle similaire dans lequel un disque bicortical d'os pariétal était prélevé puis repositionné dans le site de prélèvement de façon bilatérale chez 41 brebis. Les animaux étaient divisés en trois groupes : fixation circonférentielle par l'adhésif (Tetranite®) (N=27 sites opératoires), fixation de la moitié de la circonférence par de l'adhésif (N=26 sites opératoires) ou fixation par 3 plaques métalliques d'ostéosynthèse (N=23 sites opératoires). Les animaux étaient sacrifiés à 12 semaines, 1 an ou 2 ans, avant d'être analysés soit histologiquement avec histomorphométrie soit mécaniquement par un test de poussée (*pushout test*). En plus des données de biocompatibilité, de résorption et de formation de tissu osseux, l'analyse biomécanique permet d'évaluer l'adhésion au niveau du site crânien, donc en zone non contrainte mécaniquement.

Procter *et al.* (22) décrivaient un modèle dans lequel un bouchon osseux de métaphyse fémorale de rat était prélevée puis repositionnée dans le site de prélèvement (après mise en place d'une vis de traction) et fixée par une colle de fibrine (faisant office de contrôle) d'un côté et par l'adhésif étudié (OsStic™) de l'autre côté. Les sacrifices étaient réalisés à 0, 3, 7, 14 et 28 jours (N=4 par groupe à chaque période). Un test mécanique de traction sur la vis implantée était ensuite réalisé, de façon similaire à celui décrit par Procter *et al. ex vivo* (37). De plus, une étude longitudinale complémentaire sur 6 rats était réalisée (la seule modification est l'absence de vis implantée dans le bouchon osseux), étudiés par une microtomodensitométrie hebdomadaire pendant 42 jours et une analyse histologique après sacrifice à 42 jours. Ce modèle centre l'évaluation sur l'adhésion, sans négliger l'étude de la biocompatibilité et de la résorption de l'adhésif. L'adhésion subit peu de contraintes comme la greffe correspond parfaitement à la taille de la perte de substance, au contraire d'une apposition.

Les modèles de fixation d'autogreffe permettent d'évaluer la résorption de l'adhésif et l'ostéointégration. L'évaluation des propriétés adhésives nécessitent un site où des contraintes mécaniques sont présentes (comme à la mandibule) ou l'utilisation d'un test mécanique dédié. Ces modèles correspondent à une utilisation future en clinique humaine : la fixation de greffes osseuses pour la reconstruction squelettique.

#### 2.4.4.5.5 Modèles animaux de fractures avec contrainte mécanique faible

Ces modèles comprennent une ostéotomie et un collage de deux fragments osseux. Il s'agit de l'utilisation clinique future de l'adhésif. Toutefois, les contraintes mécaniques au sein du joint adhésif sont faibles soit parce que l'os étudié présente lui-même des sollicitations mécaniques faibles, soit parce que l'adhésif est associé à une ostéosynthèse qui suffirait à maintenir la contention à elle seule.

Par exemple, Abou Neel *et al.* (164) décrivaient un modèle où l'os utilisé présentait de faibles sollicitations mécaniques. Ils réalisaient une ostéotomie unilatérale de la fibula chez le lapin. Les 18 lapins étaient répartis en trois groupes : absence de contention (N=4), fixation par un ciment phospho-calcique (brushite) (N=7) ou fixation par un adhésif composite (ciment phospho-calcique modifié par un polymère) (N=7). Ils étaient sacrifiés à 5 semaines. L'évaluation était réalisée par microtomodensitométrie, spectroscopie Raman et histologie dans le but d'évaluer la dégradation des matériaux et la formation de nouveau tissu osseux. La fibula du lapin est un os grêle qui fusionne avec le tibia en distalité chez le lapin (203), il n'est pas un os indépendant comme chez l'humain. La faiblesse des contraintes mécaniques est confirmée par la bonne consolidation même dans le groupe sans contention (3 fibulas sur 4). Toutefois, contrairement aux modèles précédents, l'existence de sollicitations mécaniques itératives, même faibles, permet d'étudier les conséquences de celle-ci sur le comportement de l'adhésif.

Les deux exemples suivants sont des études sur l'association d'un l'adhésif à une ostéosynthèse. Kirillova *et al.* (40) décrivaient un modèle dans lequel le condyle fémoral était sectionné puis fixé par de l'adhésif associé à 2 vis métalliques chez le lapin. Les 19 animaux étaient répartis en deux groupes : un groupe contrôle avec fixation uniquement par les vis et un groupe test avec fixation par adhésif et vis. Les animaux étaient sacrifiés à 0, 3 et 6 semaines avant d'être analysés histologiquement (N=3 par groupe par période) ou mécaniquement en cisaillement après ablation des vis (N=3 par groupe par période). Alternativement, Granskog *et al.* (133) réalisaient des ostéotomies du fémur chez 22 rats avec

une contention soit par ostéosynthèse par plaque en PEEK et vis métallique (N=9), soit par une association de cette ostéosynthèse avec l'adhésif (polymère fonctionnalisé par réaction thiol-ène) (N=13) pendant 5 semaines. L'analyse était réalisée par microtomodensitométrie (N=22), histologie (N=3 par groupe), flexion 3 points (N=9 pour le groupe contrôle et N=7 pour le groupe test).

Dans ces deux modèles, l'utilisation du matériel d'ostéosynthèse (vis et plaque) suffit à une contention efficace et donc une consolidation sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un adhésif. Ces études permettent d'évaluer l'effet de l'adhésif sur la consolidation osseuse dans une situation imitant la fixation d'une fracture. Toutefois, l'évaluation de l'adhésion peut également être réalisée pour s'assurer que l'ajout de l'adhésif ne diminue pas la solidité du foyer de fracture à la fin du délai de consolidation.

Les modèles animaux de fracture avec contrainte mécanique minimale en zone faiblement contrainte permettent une évaluation de la consolidation osseuse en présence de l'adhésif. Ils ne permettent pas d'affirmer que l'adhésif seul est capable de maintenir la contention osseuse.

#### 2.4.4.5.6 Modèles animaux de fracture avec contrainte mécanique

Ces modèles reposent sur la fixation d'une fracture au niveau d'un os subissant des contraintes mécaniques. Ces modèles évaluent les propriétés adhésives dans les conditions les plus contraignantes.

Par exemple, Bai *et al.* (149) décrivaient un modèle d'ostéotomie du fémur chez 8 rats. Ils étaient divisés en deux groupes (N=4 par groupe) : contention par l'adhésif composé d'acide tannique et de fibroïne de soie ou absence de contention et sacrifiés à 8 semaines. L'évaluation était mécanique par flexion 3 points avec comparaison avec 4 fémurs intacts. L'analyse de quatre échantillons seulement limite les résultats en raison de l'important variabilité des tests biomécaniques. Les fémurs sans fixation présentaient tous un déplacement secondaire démontrant la nécessité d'une contention pour maintenir la réduction. Il était retrouvé une résistance équivalant à 61,7% d'un fémur intact avec l'adhésif. Il aurait toutefois été intéressant de comparer aussi à un fémur traité par le *gold standard*, à savoir une ostéosynthèse plutôt qu'à une absence de traitement qui n'est pas la prise en charge recommandée.

Un autre modèle a été décrit par Palacio *et al.* (192), pour comparer deux adhésifs polycyanoacrylates, dans lequel des ostéotomies des humérus, fémurs et tibias étaient réalisées chez 90 rats. À droite, les fractures étaient immobilisées par un adhésif, tandis qu'à

gauche, il n'y avait pas de contention. Les rats étaient sacrifiés à 60, 120 et 180 jours postopératoires (N=15 par groupe pour chaque durée). Les fémurs étaient évalués mécaniquement en compression, les tibias en flexion 3 points et les humérus histologiquement avec histomorphométrie dans le but de comparer les propriétés adhésives et la réaction tissulaire des deux adhésifs. Ce modèle est particulièrement lourd et semble excessif sans moyen de contention puisqu'il entraîne 6 fractures par rat au sein de ses 4 membres, alors que la mobilisation des fragments d'une fracture est douloureuse. De plus, les résultats se concentrent sur la comparaison entre les deux adhésifs, sans comparaison au groupe sans contention. Toutefois, aucune modification clinique ou comportementale des rats n'est notée.

Ces modèles de fracture avec contrainte mécanique permettent d'apprécier les propriétés adhésives de la colle et le comportement de celle-ci lors d'une mise en charge de l'os, ce qui est la propriété voulue pour l'utilisation clinique ultérieure. L'absence de contention peut toutefois générer d'importantes douleurs en lien avec la mobilité des fragments osseux. Il peut être discuté la création d'un groupe contrôle avec ostéosynthèse classique plutôt qu'un groupe contrôle sans contention.

#### 2.4.4.5.7 Modèles animaux de fixation de matériau implantable sur l'os

La capacité d'un adhésif à fixer un matériau implantable à de l'os peut aussi être évaluée. Par exemple, un modèle évaluant l'adhésion de deux plaques d'ostéosynthèse en titane collées sur chaque crâne de 4 lapins (sans transvissage) a été décrit par Smeets *et al.* (110). Les sacrifices avaient lieu à 2 et 12 semaines (N=2 par groupe), suivi d'une évaluation mécanique en traction de la plaque. L'analyse de deux échantillons seulement limite les résultats en raison de l'important variabilité des tests biomécaniques. De plus, le crâne étant une zone sans contrainte mécanique, l'objectif est donc purement d'évaluer les propriétés adhésives vis-à-vis de l'os et du titane hors de toute contrainte mécanique.

Il ne s'agit pas d'évaluer un adhésif pour une fixation osseuse mais plutôt comme auxiliaire d'une ostéosynthèse ce qui aurait un intérêt dans les cas où des contraintes mécaniques majeures s'appliquent.

#### 2.4.4.5.8 Résumé des modèles animaux d'évaluation des adhésifs osseux

De façon similaire aux tests mécaniques, il existe de nombreux modèles animaux publiés dans la littérature. Les variabilités inter et intra espèces, le type d'intervention (implantation, comblement de perte de substance, fixation d'autogreffe, ostéotomie), les os

étudiés, les charges mécaniques ainsi que les périodes considérées aboutissent à un large panel de modèles expérimentaux à l'origine de résultats hétérogènes et comparaisons difficiles. Si les modèles d'implantation permettent d'évaluer efficacement la biocompatibilité, celle-ci peut être également étudiée de façon concomitante à d'autres paramètres dans des modèles plus complexes. La présence de contraintes mécaniques, même faibles, est un élément important pour l'évaluation d'un adhésif osseux puisque la principale fonction du squelette est de faire face à ces contraintes mécaniques. Il est important d'évaluer l'adhésion qui est la raison d'être de l'adhésif et de se rapprocher de l'utilisation clinique ultérieure.

Trois modèles animaux de rats ont été développés pour évaluer la biocompatibilité et l'efficacité *in vivo* de l'adhésif dans ce travail :

- Un modèle d'ostéotomie tibiale : le tibia était sectionné de façon unilatérale et fixé par une ostéosynthèse par plaque transvissée (groupe contrôle) ou par broche centromédullaire isolée ou par adhésif (TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA) combiné avec une broche centromédullaire. Ce modèle correspond donc à un modèle de fracture avec contrainte mécanique.
- Un modèle de fixation d'autogreffe de fibula sur tibia : un segment de fibula était prélevé et apposé sur le tibia homolatéral de façon bilatérale. La greffe était soit non-fixée (groupe contrôle) ou fixée par adhésif (TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA). Ce modèle correspond donc à un modèle de fixation d'autogreffe. L'autogreffe est apposée et ne comble pas une perte de substance, elle est donc soumise à des contraintes mécaniques liées aux tissus mous.
- Un modèle d'ostéotomie de la fibula : la fibula était sectionnée de façon bilatérale au niveau de la jonction avec le tibia. Elle était ensuite soit non-fixée (groupe contrôle), soit fixée par adhésif TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA. Ce modèle correspond donc à un modèle de fracture avec contrainte mécanique faible.

## **2.5 Objectif de la thèse**

L'objectif de ce travail est de développer un adhésif adapté au tissu osseux pour remplacer les implants métalliques utilisés actuellement. Un adhésif organo-minéral combinant de l'OPS et du TTCP est associé à des nPDA pour augmenter ses propriétés adhésives et de biominéralisation. De plus, l'ajout des nPDA permettra de conférer à l'adhésif de nouvelles fonctionnalités telles que des propriétés antibactérienne ou ostéoinductrices par exemple. La combinaison de ces trois éléments est innovante et biomimétique.

Dans ce travail, la formulation de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA sera tout d'abord optimisée. Les propriétés mécaniques (*in vitro* et *ex vivo*), de minéralisation ainsi que la stérilisabilité seront ensuite évaluées. Trois modèles animaux chez le rat ont été conçus pour évaluer la biocompatibilité et l'efficacité *in vivo* de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA. Finalement, la possibilité de doter l'adhésif osseux de propriétés antibactériennes par le chargement de ciprofloxacine dans les nPDA a été évaluée.



### **3. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

---



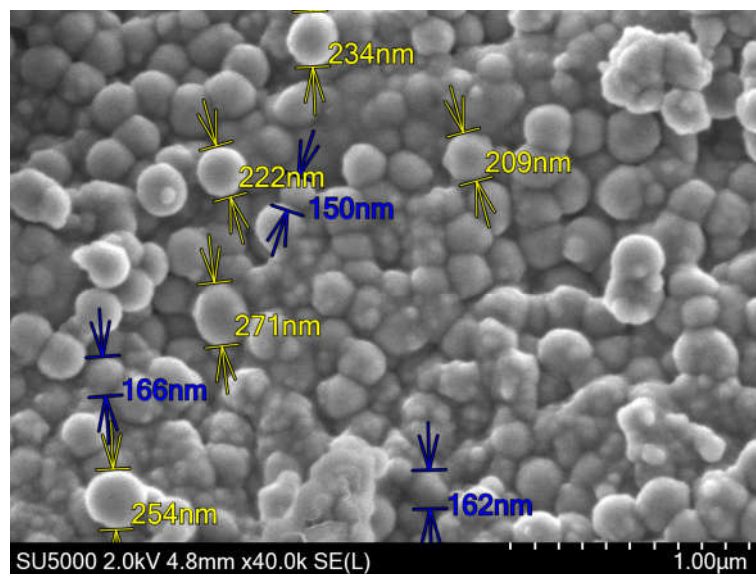
### 3.1 Matériel

Les ingrédients inclus dans la formulation de l'adhésif sont les suivants :

La poudre de TTCP provenait de chez Matexcel® (Bohemia, New York, États-Unis d'Amérique).

La poudre d'OPS provenait de chez Merck® (Darmstadt, Allemagne).

Les nPDA étaient synthétisées selon le protocole de Ju *et al.* (204) : 900 mg de chlorhydrate de dopamine étaient dissous dans 450 mL d'eau déminéralisée, puis la solution est chauffée pour atteindre 50°C. Lorsque cette température était atteinte, il fallait ajouter 3,8 mL d'hydroxyde de sodium et ensuite maintenir la solution à 50°C sous vive agitation pendant 5 heures. La solution était refroidie puis dialysée pendant 48 heures dans de l'eau à l'aide de membranes de 1000 Daltons Spectra/Por® 7 (Spectrum Labs, Repligen, Waltham, Massachusetts, États-Unis d'Amérique). Le dialysat contenant la suspension de nPDA était finalement lyophilisé pour obtenir la poudre de nPDA présentant un diamètre de 150 à 250 nm (Figure 2).



**Figure 2** : Image acquise par microscopie électronique à balayage montrant la morphologie et les dimensions des nPDA produites

### 3.2 Méthode de préparation de l'adhésif avec ou sans nPDA

Les poudres de TTCP et d'OPS avec ou sans poudre de nPDA étaient mélangées dans un mortier à l'aide d'une spatule puis d'un pilon (environ 30 s) jusqu'à obtenir une poudre macroscopiquement homogène. Les quantités des différentes poudres étaient précisément définies en pourcentage molaire (%<sub>mol</sub>) d'OPS dans le mélange TTCP/OPS et en pourcentage massique (%<sub>wt</sub>) de nPDA dans le mélange TTCP/OPS-nPDA. Du tampon phosphate salin (PBS pour *phosphate-buffered saline*) de pH de 7,4, était ajouté au mélange de poudre à la micropipette. Le volume ajouté dépendait du ratio liquide/poudre prédéfini. La poudre était mélangée avec le PBS à l'aide d'une spatule pendant 20 s jusqu'à obtention d'une pâte visqueuse et cohésive. Cette dernière était alors appliquée sur les surfaces à coller.

Il faut noter que le mélange de poudre de TTCP/OPS avec de l'eau permet aussi d'obtenir une pâte adhésive, mais le PBS a été préféré pour éviter les variations de pH liées à la dissolution de l'OPS qui est un acide aminé. Par ailleurs, le mélange manuel augmente la porosité par rapport à un mélange instrumental, permettant une meilleure croissance tissulaire au sein de l'adhésif. Il est également facile à réaliser et ne nécessite pas de matériel spécifique, ce qui permet de l'adapter à toutes les situations, notamment le bloc opératoire.

### 3.3 Optimisation de la formulation de l'adhésif par des tests mécaniques instrumentaux

L'évaluation de la composition de l'adhésif sur la force adhésive était réalisée à l'aide de test instrumentaux en traction uniaxiale sur des échantillons cylindriques en titane collés.

#### 3.3.1 Formulations à évaluer

Les paramètres suivants ont été étudiés à la recherche de la formulation optimale, c'est-à-dire celle présentant la force adhésive la plus importante :

- Le pourcentage molaire d'OPS dans le mélange TTCP/OPS (30%<sub>mol</sub>, 45%<sub>mol</sub>, 50%<sub>mol</sub>, 55%<sub>mol</sub> et 65%<sub>mol</sub>)
- Le ratio liquide/poudre (0,17, 0,21 et 0,25 mL/g)
- Le pourcentage massique de nPDA dans le mélange TTCP/OPS-nPDA (2%<sub>wt</sub>, 5%<sub>wt</sub> et 10%<sub>wt</sub>)

### 3.3.2 Tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale

Les échantillons de traction utilisés lors des tests mécaniques d'optimisation de la formulation de l'adhésif étaient en titane. En effet, le titane est le matériau constituant la plupart des implants métalliques utilisés en pratique clinique. L'adhésion à ce matériau a donc un intérêt clinique. De plus, il est plus aisé d'obtenir et de standardiser des échantillons en titane, un matériau produit artificiellement, que des échantillons en os animal, un matériau naturel. Il est ainsi plus pratique d'utiliser le titane dans un premier temps pour le criblage des différentes formulations d'adhésifs. Les échantillons de traction étaient des cylindres en titane de 8 mm de diamètre et 20 mm de longueur, obtenus en découpant une barre de titane Goodfellow® (Huntingdon, Royaume-Uni). Les surfaces de collage des échantillons étaient polies avec du papier abrasif P1200 juste avant de réaliser les collages.

Une fine couche d'adhésif, fabriquée selon la description en 3.2, était appliquée en fine couche sur les surfaces à coller des cylindres de titane. Les cylindres étaient ensuite collés ensemble dans une configuration bout-à-bout (minimum N=8 pour chaque expérience), puis comprimés manuellement pendant 4 minutes avant d'être immergées dans un bain de PBS à 37°C pendant 1 ou 24 heures, simulant ainsi un environnement aqueux physiologique.

L'évaluation de la force adhésive était réalisée en traction uniaxiale jusqu'à rupture sur un extensomètre Instron® 4466 (Norwood, Massachusetts, États-Unis d'Amérique) (Figure 3). Les paramètres suivants étaient utilisés : cellule de charge de 10 kN et vitesse de déplacement de 0,1 mm/s. La contrainte maximale en traction (en MPa) était relevée, c'est-à-dire la force appliquée par unité de surface sur les échantillons collés lors de la rupture.



Figure 3 : Test mécanique de traction uniaxiale avec cylindres de titanes collés en cours sur un extensomètre Instron® 4466

### 3.4 Caractérisation de l'adhésif optimisé

#### 3.4.1 Tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale d'échantillons en os bovin *ex vivo* collés

Une fois la formulation de l'adhésif optimisée à l'aide des tests mécaniques avec des cylindres en titane standardisés, il s'agissait d'évaluer les propriétés adhésives envers le substrat cible : le tissu osseux. Les cylindres de titane étaient alors remplacés par des cuboïdes rectangulaires d'os cortical bovin appairés entre eux (minimum N =8 pour chaque expérience). Ces cuboïdes rectangulaires d'os présentaient des surfaces à coller de 100 à 180 mm<sup>2</sup>. L'os provenait de diaphyse de fémurs de vache procurés par une boucherie locale. Ces échantillons étaient conservés à -20°C avant le test. Les surfaces de collage des échantillons étaient polies avec du papier abrasif P1200 juste avant de réaliser les collages. Le test mécanique *ex vivo* en traction uniaxiale était réalisé de façon similaire à celui avec les cylindres de titane sur le même extensomètre Instron® 4466, comme décrit ci-dessus (3.3.2), à l'exception de la cellule de charge de 1 kN au lieu de 10 kN. La contrainte maximale en traction (en MPa) était relevée, c'est-à-dire la force appliquée par unité de surface sur les échantillons collés lors de la rupture.

### **3.4.2 Tests mécaniques manuels en traction d'un collage de fibula sur tibia de rat ex vivo**

Afin de se rapprocher de l'application clinique ultérieure de l'adhésif comparativement aux conditions standardisées des tests précédents (3.3.2 et 3.4.1), un deuxième test sur tissu osseux était ensuite réalisé avec des segments de fibula de rat collés sur des tibias de rat *ex vivo*. En effet, le collage de la fibula sur le tibia constitue une simulation de la fixation d'une autogreffe osseuse. Le test de traction devait être exécuté de façon manuelle avec ces échantillons en raison de l'absence de conformité de ces échantillons vis-à-vis des prérequis de l'extensomètre Instron® 4466.

Des tibias entiers et des segments de fibulas de 6 mm de long (1 mm de diamètre) de rat, appariés entre eux, présentant des surfaces à coller de 6 mm<sup>2</sup> ont été utilisés pour ces tests. Ces os étaient prélevés immédiatement avant le test mécanique sur des rats Sprague-Dawley sacrifiés dans le cadre d'un autre protocole expérimental ne s'intéressant qu'à la tête du rat, en respect du principe des trois R (Réduire, Remplacer et Raffiner). La surface externe du tibia était légèrement décorticalisée à la fraise boule.

Une fine couche de colle était appliquée sur la face latérale de la diaphyse tibiale (minimum N=7 pour chaque expérience). Un fil de Vicryl® 4/0 (Ethicon, Raritan, New Jersey, États-Unis d'Amérique) était placé au milieu de la colle déjà appliquée, de façon perpendiculaire au plus grand axe du tibia, puis le segment de fibula (l'autogreffe) était collé sur le tibia (Figure 4). Les échantillons collés étaient alors comprimés manuellement pendant 4 minutes avant d'être immergés dans un bain de PBS à 37°C pendant 1 ou 24 heures. L'évaluation de l'adhésion était réalisée en traction à l'aide de poids standardisés (Mettler-Toledo SAS, Viroflay, France) attachés au fil de Vicryl®. Comme démontré sur la Figure 5, le nombre de poids était augmenté progressivement jusqu'à rupture, la somme de ces poids permettant de définir la force appliquée lors de la rupture. La contrainte maximale en traction (en MPa) était relevée, c'est-à-dire la force appliquée par unité de surface sur les échantillons collés lors de la rupture.



Figure 4 : Segment de fibula de 6 mm de long collé sur la diaphyse tibiale avec interposition d'un fil de Vicryl® permettant le test mécanique par traction



Figure 5 : Test de traction *ex vivo* d'un segment de fibula collé sur un tibia de rat avec mise en charge progressive par des poids standardisés

### **3.4.3 Tests mécaniques en compression de l'adhésif seul**

La cohésion de l'adhésif, donc la résistance mécanique de la colle après prise complète, est un important facteur à évaluer. Des tests mécaniques en compression étaient réalisés sur des échantillons d'adhésif. Ces échantillons étaient préparés en remplissant d'adhésif un moule de polyéthylène (9 mm de diamètre et 9 mm de long). Un temps de latence de 30 minutes était respecté pour s'assurer d'une prise complète de l'adhésif. Les cylindres d'adhésif étaient alors délicatement démoulés avant d'être immergés dans un bain de PBS pendant 24 heures à 37°C (minimum N=8 pour chaque expérience).

Le test mécanique en compression était réalisé sur une machine Instron® 5966 (Norwood, Massachusetts, États-Unis d'Amérique) avec les paramètres suivants : vitesse de déplacement de 0,5 mm/min et cellule de charge 10 kN. La contrainte maximale en

compression (en MPa) était relevée, c'est-à-dire la force appliquée par unité de surface sur les échantillons lors de la rupture.

#### **3.4.4 Mesure du temps de prise de l'adhésif**

L'évaluation du temps de prise de l'adhésif était réalisée selon la norme ASTM C266-18, qui sert de référence pour l'évaluation du temps de prise d'un ciment. La mesure est basée sur le principe du dispositif à aiguille de Gillmore qui différencie la prise initiale, déterminée à l'aide d'une aiguille de 2,12 mm de diamètre appliquée avec une force de 113,4 g, de la prise finale, déterminée à l'aide d'une aiguille de 1,06 mm appliquée avec une force de 453,6 g. Les échantillons d'adhésif étaient préparés sur un support en polyéthylène par pression manuelle de l'adhésif à l'état de pâte pour former des disques de 1 cm de diamètre et 2 mm de hauteur. L'aiguille test était alors appliquée contre la surface du disque de façon régulière avec les forces mentionnées ci-dessus. Le temps de prise initial et final était défini comme le temps entre le début de la préparation de l'adhésif et le durcissement initial ou final de l'adhésif.

#### **3.4.5 Test de minéralisation dans le fluide corporel simulé**

La formation d'une couche d'apatite semblable à l'os sur la surface d'un matériau implanté *in vivo* est un prérequis essentiel à l'adhésion au tissu osseux (205). Cette minéralisation peut être reproduite *in vitro* par immersion dans du fluide corporel simulé (SBF pour *simulated body fluid*) acellulaire présentant des concentrations ioniques similaires au plasma humain (205). La bioactivité *in vivo* d'un matériau vis-à-vis du tissu osseux peut donc être prédite par la minéralisation de surface du matériau après immersion dans le SBF (206).

Le SBF était préparé selon le protocole décrit par Kokubo *et al.* (206). Les disques d'adhésif étaient produits de façon similaire à ceux utilisés pour l'évaluation du temps de prise. Ils étaient ensuite laissés 30 minutes à l'air pour compléter la prise, avant d'être immergés dans le SBF à 37°C pendant 4 ou 7 jours. Le volume de SBF correspondait à 20 fois le volume du disque d'adhésif. Le SBF était totalement renouvelé toutes les 48 heures.

A la fin du délai de 4 ou 7 jours, une analyse de diffraction aux rayons X (DRX) à l'aide du dispositif Xeuss<sup>®</sup> 2.0 (Xenocs, Grenoble, France) était d'abord réalisée afin de déterminer la nature de la substance ayant précipité en surface, notamment afin de différencier entre le TTCP (composant de l'adhésif) et l'hydroxyapatite (minéral précipité). Ensuite, la morphologie de surface des échantillons était analysée par microscopie électronique à balayage (MEB) avec le microscope SU 5000<sup>®</sup> (Hitachi, Tokyo, Japon) paramétré de la manière suivante : tension d'accélération de 7 kV et courant de sonde de 0,1 nA. L'observation microscopique

permettait d'observer la surface des échantillons afin d'évaluer la morphologie et la répartition de la minéralisation de surface.

### **3.5 Impact de la stérilisation sur les propriétés de l'adhésif optimisé**

La stérilisation est absolument nécessaire pour tout matériau implantable. Plusieurs méthodes de stérilisation existent, il convient de choisir la plus adaptée au matériau à stériliser. Par exemple, la vapeur d'eau sous pression ne convient pas aux CPC, en effet, le ciment commencerait à se former au contact de la vapeur d'eau. L'oxyde d'éthylène (195), comme l'irradiation aux rayons  $\gamma$  (196) sont des méthodes courantes qui permettent de stériliser les CPC. L'oxyde d'éthylène (OE) est la méthode de stérilisation la plus fréquemment utilisée pour les matériaux sensibles à l'humidité (194), ce qui concerne donc les CPC. La structure cyclique de l'OE est responsable de l'alkylation des groupements actifs amino, carboxy, hydroxy et mercapto des protéines qui entraîne l'éradication des bactéries. Néanmoins, ce traitement alkylera aussi les groupements actifs du matériau à stériliser et affectera donc ses propriétés mécaniques et/ou biologiques. L'irradiation aux rayons  $\gamma$  est une méthode alternative de stérilisation qui repose sur l'action ionisante des rayons électromagnétiques de haute énergie. L'ionisation des composants moléculaires des bactéries génère des radicaux libres instables qui entraîne l'éradication des bactéries. A l'inverse de l'OE, il n'y a aucun résidu au sein du matériau après irradiation aux rayons  $\gamma$ . La haute énergie des rayons peut toutefois également affecter les propriétés physico-chimiques, mécaniques et/ou biologiques des matériaux.

Ces deux méthodes seront appliquées et évaluées afin de stériliser l'adhésif osseux.

#### ***3.5.1 Processus de stérilisation appliqué***

Les poudres de TTCP, d'OPS et de nPDA étaient stérilisées séparément par l'une des deux méthodes suivantes pour comparaison :

- Stérilisation par irradiation  $\gamma$ , avec une dose de 40 Gy selon les recommandations de la norme ISO 11137
- Stérilisation par oxyde d'éthylène (OE), avec les paramètres suivants : concentration en gaz à 500 mg/L, température à 43°C, humidité relative à 60%, exposition pendant 5 heures

La stérilisation, quelle que soit la méthode, était réalisée par Cousin Biotech® (Wervicq-Sud, France).

### **3.5.2 Évaluation de l'impact de la stérilisation sur l'adhésion**

L'impact de la stérilisation sur les propriétés adhésives de la colle était évalué par un test mécanique en traction uniaxiale avec des cylindres en titane, à l'aide de l'extensomètre Instron® 4466, de façon similaire à la description en 3.3.2. Les résultats obtenus avec les poudres stérilisées étaient comparés avec ceux obtenus avec les poudres non stérilisées.

### **3.5.3 Évaluation de l'efficacité de la méthode de stérilisation par l'essai de stérilité**

L'essai de stérilité, exigé par les Bonnes Pratiques de Fabrication, est indispensable pour confirmer l'absence de micro-organismes viables au sein des poudres stérilisées et donc confirmer la validité du processus de stérilisation. Ce test était réalisé selon la norme WHO QAS/11.413. Après traitement par irradiation  $\gamma$  ou par OE, 100 mg de chaque poudre (TTCP, OPS et nPDA) était versée dans 10 mL de bouillon cœur-cervelle (BCC) à 37°C. Un prélèvement de 0,1 mL du mélange poudre/BCC était réalisé, après homogénéisation, à 1, 7, 14 et 21 jours, avant d'être étalé sur une plaque de gélose BCC. Celle-ci était alors incubée 24 heures à 37°C avant d'être examinée à la recherche de colonies de bactéries.

## **3.6 Évaluation de la cytotoxicité de l'adhésif**

L'objectif de cette évaluation était de déterminer si la formulation optimale de l'adhésif entraînait une cytotoxicité vis-à-vis des cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 en utilisant la méthode d'extraction selon les recommandations de la norme ISO 10933-5.

Des cellules préostéoblastiques MC3T3-E1 étaientensemencées avec une densité de  $4.10^3$  par puits sur une plaque de 96 puits (Falcon®, Merck, Darmstadt, Allemagne), puis cultivées pendant 24 heures jusqu'à ce que des confluences cellulaires de 60% soient obtenues.

Parallèlement, l'adhésif était façonné en disque de 8 mm de diamètre pour 2 mm de hauteur (poids de 240 mg), qui étaient laissés 30 minutes à l'air pour dépasser le délai de prise finale. Ils étaient alors rincés par 2 mL de milieu sans sérum pendant 5 minutes. L'extraction était alors réalisée en immergeant les disques d'adhésif dans du milieu de culture complet (alphaMEM, Gibco®, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis d'Amérique), contenant 10% de sérum de veau fœtal et 50  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicine, en respectant le ratio de 0,2 g/mL, pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$ . Après ces 24 heures, les échantillons étaient retirés tandis que le pH du milieu

d'extraction était mesuré (pH de 5 environ) et neutralisé avec de l'hydroxyde de sodium à 1 mol/L. Ces échantillons étaient alors stérilisés à l'aide de filtres de polytétrafluoroéthylène de 0,2 µm (Starlab®, Orsay, France). Le milieu dans les puits de la plaque 96 puits, où les cellules étaient cultivées pendant 24 heures, était totalement remplacé par 100 µL de milieu d'extraction non dilué (100%).

L'activité métabolique cellulaire était évaluée par le test à la résazurine (Alamar Blue®, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis d'Amérique) en appliquant une solution de résazurine 10% dans le milieu de culture complet sur les cellules (200 µL/puits). Les cellules étaient alors incubées pendant 2 heures, tandis que 150 µL de milieu était prélevé tout en prenant garde à ne pas l'exposer au soleil. Finalement, la fluorescence était mesurée à 560 nm et 590 nm sur un spectrophotomètre (CLARIOstar®, BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne). Le signal blanc (10% de solution de résazurine) était soustrait à chaque échantillon. L'intensité de la fluorescence était normalisée avec le groupe contrôle pour obtenir un pourcentage représentant le taux de survie.

### **3.7 Évaluation *in vivo* de l'adhésif**

Trois modèles animaux de rats ont été développés dans ce travail pour évaluer *in vivo* l'adhésif osseux optimisé :

- Un modèle d'ostéotomie tibiale consistant en une ostéotomie de la diaphyse du tibia, sa réduction et sa fixation. Ce modèle correspond à un modèle de fracture avec contrainte mécanique importante.
- Un modèle de fixation d'autogreffe osseuse consistant en un prélèvement d'un segment de fibula, puis son apposition et sa fixation au tibia homolatéral. Ce modèle a pour but d'évaluer l'efficacité de l'adhésif pour la contention d'une autogreffe en apposition. Ce modèle est sujet à des contraintes mécaniques faibles.
- Un modèle d'ostéotomie de la fibula consistant en une ostéotomie de la fibula au niveau de sa jonction avec le tibia, sa réduction et sa fixation. Ce modèle correspond à un modèle de fracture avec contrainte mécanique faible.

#### **3.7.1 Animaux**

La procédure expérimentale a été approuvée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale numéro 75 du Nord-Pas-de-Calais (CEEA-75) avec le numéro d'agrément D5935010.

L'hébergement et les procédures chirurgicales ont été réalisées au sein du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE) de l'Université de Lille dans le respect de la réglementation européenne au sujet de la protection des animaux (Directive 2010/63/EU).

Les 88 rats Sprague-Dawley mâles, âgés de 2 mois (250-300 g), étaient répartis dans les trois modèles animaux suivants :

- Modèle d'ostéotomie tibiale (N=48 rats)
- Modèle de fixation d'autogreffe osseuse (N=28 rats)
- Modèle d'ostéotomie fibulaire (N=12 rats)

Toutes les interventions chirurgicales étaient exécutées en condition d'asepsie stricte. L'induction de l'anesthésie générale était réalisée dans une chambre d'induction adaptée délivrant un mélange de dioxygène et d'isoflurane à 4-5%. L'anesthésie générale était ensuite maintenue à l'aide d'un masque facial adapté par un mélange de dioxygène et d'isoflurane à 1,5-2,5%. Chaque animal recevait une injection intramusculaire préopératoire chlorhydrate de buprénorphine (0,05 mg/kg).

### **3.7.2 Modèle d'ostéotomie tibiale**

Le modèle d'ostéotomie tibiale correspond cliniquement à un modèle de fracture avec contrainte mécanique. Ce modèle a pour but d'évaluer l'efficacité de l'adhésif pour la contention d'une fracture dans une zone à forte contrainte mécanique. Il s'agissait de réaliser une ostéotomie de la diaphyse du tibia à foyer ouvert puis de réduire et fixer les deux fragments par plaque d'ostéosynthèse transvissée (groupe contrôle), ou de réduire les deux fragments par une broche centromédullaire et de les fixer par adjonction ou non d'un adhésif. L'intervention était réalisée de façon unilatérale.

Les rats (N=48) étaient répartis en quatre groupes selon le traitement réalisé (Figure 6) :

- fixation par encollage par l'adhésif TTCP/OPS combiné avec une broche centromédullaire : N=8 à 5 semaines et N=10 à 10 semaines
- fixation par encollage par l'adhésif TTCP/OPS-nPDA combiné avec une broche centromédullaire : N=10 à 5 semaines et N=9 à 10 semaines
- ostéosynthèse par broche centromédullaire isolée : N=3 à 5 semaines et N=2 à 10 semaines
- ostéosynthèse par plaque Ratfix® (Risystem, Landquart, Suisse) en PEEK transvissée par des vis métalliques : N=4 à 5 semaines et N=2 à 10 semaines

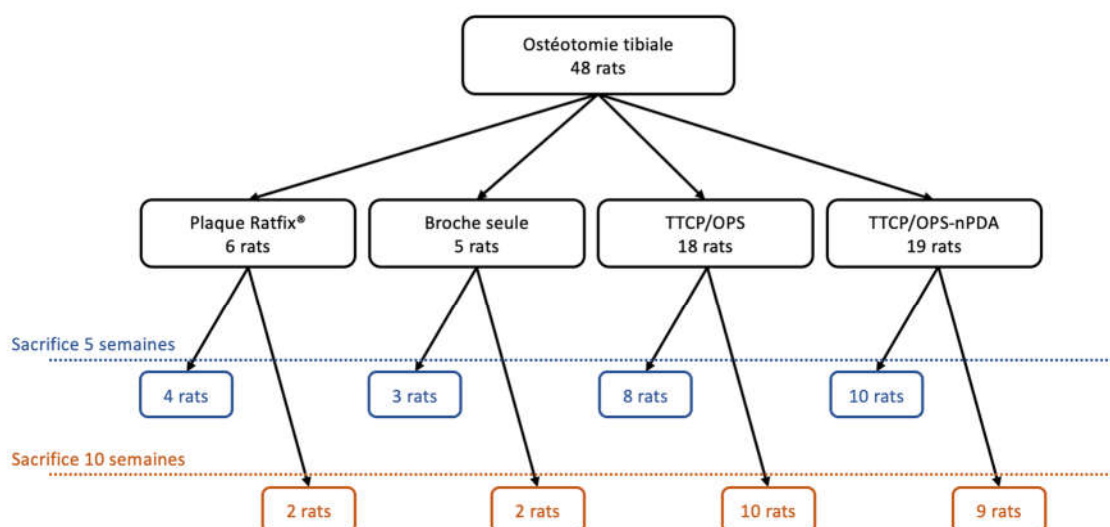


Figure 6 : Diagramme de flux du modèle animal d'ostéotomie tibiale

### 3.7.2.1 Procédure chirurgicale

Les rats étaient installés en décubitus dorsal. L'intervention était réalisée de façon unilatérale. Une incision cutanée de la jambe droite au bistouri froid était réalisée en regard de la face antérieure du tibia. Le périoste tibial était ensuite incisé et le tibia disséqué en sous-périosté. La fibula était fracturée à la rugine. L'ostéotomie du tibia était réalisée à la scie de Gigli 0,44 mm. Une broche centromédullaire conformée de 1 mm de diamètre et d'environ 20mm de long était mise en place. Un trou en proximal et en distal à l'aide d'une fraise à os était foré pour repérer la mobilisation en rotation. L'encollage était réalisé par application de la colle au niveau des berges osseuses sous aspiration (Figure 7). La fracture était alors réduite et la réduction maintenue pendant 4 minutes.

Dans le groupe traité par ostéosynthèse par plaque transvissée, la plaque Ratfix® en PEEK était transvissée par des vis en titane avant la réalisation de l'ostéotomie à la scie de Gigli (Figure 7). Aucune broche n'était mise en place dans ce groupe.

La fermeture était réalisée en plusieurs plans : profond au Vicryl® 4/0 (Ethicon®, Raritan, New Jersey, États-Unis d'Amérique) et sous-peau au Vicryl® 4/0. De la colle cutanée Dermabond® (Ethicon®, Raritan, New Jersey, États-Unis d'Amérique) était ensuite appliquée sur la plaie pour éviter la section des fils et l'ouverture de la plaie par le rat lui-même.

Des radiographies de la jambe de face et de profil étaient immédiatement réalisées à l'amplificateur de brillance (Siremobil Compact L, Siemens, Munich, Allemagne) afin de contrôler la réduction et de servir de comparatif ultérieur. Des radiographies intermédiaires étaient également réalisées (à 1, 3 et 6 semaines) pour contrôler la présence ou l'absence de déplacement secondaire.



Figure 7 : Photographies peropératoires du modèle d'ostéotomie : à gauche, fracture encollée par TTCP/OPS-nPDA associée à une broche centromédullaire ; à droite ostéosynthèse par plaque Ratfix® en PEEK transvissée.

### 3.7.2.2 Procédure d'euthanasie et évaluation clinique

Les rats étaient sacrifiés à 5 semaines (N=25 rats) ou à 8 semaines (N=23 rats) selon la répartition suivante indiqué dans la Figure 6.

Après induction par un mélange de dioxygène et d'isoflurane 5%, l'euthanasie était réalisée par injection intra-cardiaque de 0,3 mL/kg de T61® (MSD, Kenilworth, New Jersey, États-Unis d'Amérique). Des radiographies de la jambe de face et de profil étaient réalisées à l'amplificateur de brillance. La procédure de prélèvement comprenait d'abord une reprise de l'abord chirurgical, puis une dissection du tibia et une ostéotomie du tibia à la scie circulaire en proximal et en distal à distance de la zone d'intérêt. La broche centromédullaire était extraite.

Une évaluation macroscopique de la zone fracturée était réalisée à la recherche de signes d'inflammation ou d'infection. Une mobilisation manuelle du foyer de fracture était réalisée à la recherche d'une mobilité pathologique. Le succès clinique était défini comme une tenue mécanique lors de la mobilisation ainsi qu'une absence de déplacement secondaire.

L'échantillon était ensuite fixé 24 heures dans de la formaline tamponnée neutre 10%.

### 3.7.2.3 *Évaluation microtomodensitométrique*

L'acquisition microtomodensitométrique ( $\mu$ TDM) était réalisée à l'aide du Skyscan® 1172 (Bruker microCT, Kontich, Belgique) avec les paramètres suivants : voltage à 100 kV, courant à 100  $\mu$ A, rotation de l'image à 0,1500, taille du pixel à 19,99  $\mu$ m. Les coupes multiplanaires ont été reconstruites à l'aide du logiciel NRecon (Bruker micro CT, Kontich, Belgique). L'effet de durcissement du faisceau (*beam hardening*) notamment sur le matériel métallique (vis) était réduit par le logiciel de reconstruction.

Une évaluation qualitative observationnelle des images  $\mu$ TDM était réalisée afin de décrire la jonction tibia-adhésif-tibia : continuité entre les os et l'adhésif, présence d'un cal osseux, présence d'ostéolyse ou d'inflammation locale. L'échantillon était considéré soit consolidé, soit en cours de consolidation, soit non consolidé. La consolidation était définie par l'existence d'une continuité osseuse interfragmentaire. La non consolidation était définie par l'absence de continuité osseuse interfragmentaire ou par l'existence d'une comminution interfragmentaire.

### 3.7.2.4 *Évaluation histologique*

Après 24 heures de fixation dans le formol, les échantillons étaient décalcifiés à l'aide d'une solution d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) (VWR, Pennsylvanie, Etats-Unis) à 15% renouvelée toutes les 48 heures pendant 2 semaines. Les échantillons étaient ensuite inclus en paraffine à l'aide d'un automate Excelsior AS (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis d'Amérique). Les coupes du bloc de paraffine étaient réalisées au microtome permettant l'obtention de coupes histologiques de 3 à 5  $\mu$ m d'épaisseur. Les coupes étaient recueillies sur lames de verres et mise en séchage, puis étaient colorées par l'association d'hématoxyline et d'éosine.

L'analyse histologique était descriptive et permettait d'analyser la réaction tissulaire vis-à-vis de l'adhésif. Elle permettait également l'évaluation de la consolidation osseuse histologique.

### 3.7.3 *Modèle de fixation d'autogreffe osseuse*

Le modèle de fixation d'autogreffe osseuse comprenait le prélèvement d'un segment de fibula, puis son apposition et sa fixation au tibia homolatéral. Ce modèle a donc pour but d'évaluer l'efficacité de l'adhésif pour la contention d'une autogreffe en apposition. Ce modèle

est sujet à des contraintes mécaniques faibles, en effet, les charges mécaniques sont supportées par le tibia mais des contraintes mécaniques sont générés par les mouvements musculaires.

L'intervention était réalisée de façon bilatérale. Les 28 rats, correspondant à 56 sites opératoires, étaient répartis en trois groupes (Figure 8) :

- apposition de l'autogreffe de fibula sur le tibia sans fixation : N=5 sites opératoires à 5 semaines et N=1 site opératoire à 12 semaines
- apposition de l'autogreffe de fibula sur le tibia avec collage par TTCP/OPS : N=18 sites opératoires à 5 semaines et N=7 sites opératoires à 12 semaines
- apposition de la greffe de fibula sur le tibia avec collage par TTCP/OPS-nPDA : N=17 sites opératoires à 5 semaines et N=8 sites opératoires à 12 semaines

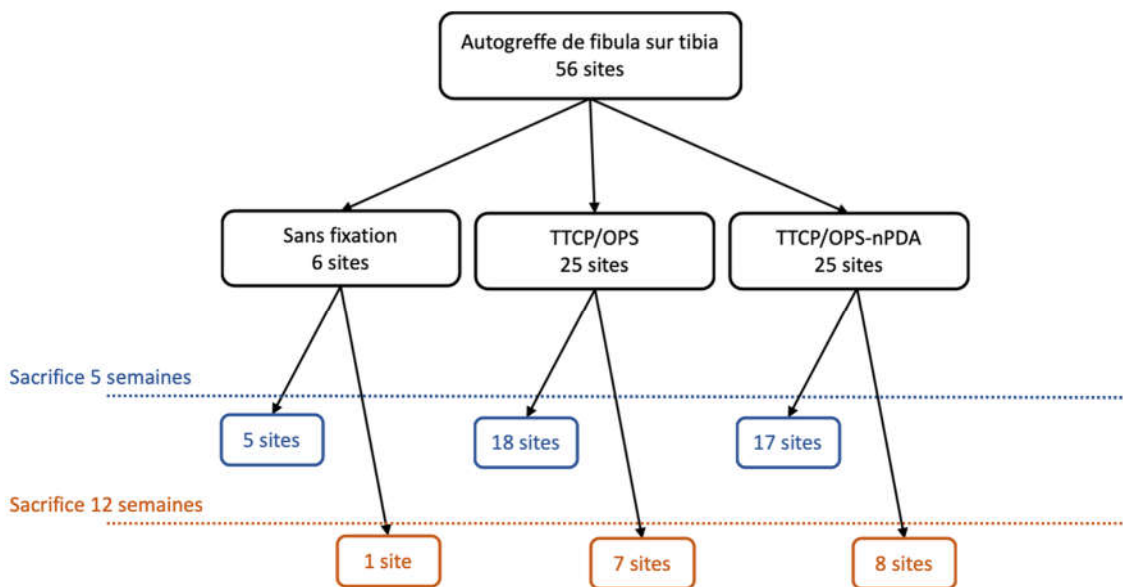


Figure 8 : Diagramme de flux du modèle de fixation d'autogreffe fibulaire sur le tibia

### 3.7.3.1 Procédure chirurgicale

Les rats étaient opérés de façon bilatérale. Ils étaient installés en décubitus dorsal. Une incision cutanée de la jambe au bistouri froid était réalisée en regard de la face antérieure du tibia. Le périoste tibial était ensuite incisé et le tibia ainsi que la fibula disséqués en sous-périosté. Un fragment de 6 mm de fibula distale était prélevé, en préservant la fibula proximale et notamment la tête fibulaire (risque de lésion du nerf fibulaire). La colle était appliquée sur la diaphyse tibiale entre l'angulation et la jonction tibio-fibulaire après minime fraisage cortical. L'autogreffe était encollée et maintenue pendant 4 minutes. Dans le groupe sans fixation,

l'autogreffe était simplement apposée sur le tibia. Une vis 0,7 × 5,7 mm en supérieur était mise en place comme repère de position initiale (Figure 9).

La fermeture était réalisée en plusieurs plans : plan profond au Vicryl® 4/0 et sous-peau au Vicryl® 4/0. De la colle cutanée Dermabond® était ensuite appliqué sur la plaie pour éviter la section des fils et l'ouverture de la plaie par le rat lui-même.



Figure 9 : Photographie peropératoire d'une autogreffe fibulaire encollée par TTCP/OPS-nPDA sur un tibia de rat

### 3.7.3.2 Procédure d'euthanasie et évaluation clinique

Les rats étaient sacrifiés à 5 semaines (N=39 sites opératoires) et à 12 semaines (N=17 sites opératoires) selon la répartition indiquée dans la Figure 8. Le délai de 5 semaines correspondant au délai de consolidation osseuse chez le rat, l'efficacité de l'adhésif pour la contention du greffon peut être évaluée à ce délai.

Après induction par un mélange de dioxygène et d'isoflurane 5%, l'euthanasie était réalisée par injection intra-cardiaque de 0,3 mL/kg de T61®. La procédure de prélèvement comprenait d'abord une reprise de l'abord chirurgical, puis une dissection du tibia et une ostéotomie du tibia à la scie circulaire en proximal et en distal à distance de la zone d'intérêt.

Une évaluation macroscopique de la zone greffée est réalisée à la recherche de signes d'inflammation ou d'infection. La position de l'autogreffe par rapport à la vis est évaluée afin de détecter un éventuel déplacement secondaire. La tenue mécanique est évaluée par traction manuelle en tractant le greffon à l'aide d'une pince. Le succès clinique était défini comme une autogreffe présentant une tenue mécanique lors de la traction ainsi que l'absence de déplacement secondaire.

L'échantillon était ensuite fixé 24 heures dans de la formaline tamponnée neutre 10%.

### 3.7.3.3 Évaluation microtomodensitométrique

L'acquisition  $\mu$ TDM était réalisée à l'aide du Skyscan® 1172 (Bruker microCT, Kontich, Belgique) avec des paramètres similaires à ceux de la section 3.7.2.3. Les coupes multiplanaires ont été reconstruites à l'aide du logiciel NRecon (Bruker micro CT, Kontich, Belgique). L'effet de durcissement du faisceau (*beam hardening*) notamment sur le matériel métallique (vis) était réduit par le logiciel de reconstruction.

Une évaluation qualitative observationnelle des images  $\mu$ TDM était réalisée afin de décrire la jonction tibia-adhésif-fibula : continuité entre les os et l'adhésif, présence d'un cal osseux, présence d'ostéolyse ou d'inflammation locale. Une évaluation semi-quantitative de l'interface tibia/adhésif était également réalisée en 2 dimensions (coupes coronales et axiales) et en 3 dimensions (reconstruction volumique). La continuité entre l'adhésif et l'os tibial était estimée selon la grille du Tableau 1.

Tableau 1 : Grille d'évaluation de la continuité osseuse entre le tibia et l'adhésif analysée en deux dimensions sur des coupes axiales et coronales ainsi qu'en trois dimensions sur une reconstruction volumique de l'acquisition microtomodensitométrique

Adhésif/tibia 2D (coronal & axial) ou 3D	
Score	Description
0	0% - Continuité adhésif/tibia absente, espace vide entre l'adhésif et le tibia
1	25% - Continuité adhésif/tibia faible, espaces vides majoritaires entre l'adhésif et le tibia
2	50% - Continuité adhésif/tibia majoritaire, interstices entre l'adhésif et le tibia représentant la moitié de la longueur du collage
3	75% - Continuité importante adhésif/tibia, légers interstices entre l'adhésif et le tibia, souvent aux extrémités de l'adhésif
4	100% - Continuité adhésif/tibia totale

### 3.7.3.4 Évaluation histologique

Les échantillons prélevés (immergés dans 70% d'éthanol) étaient envoyés à LLS Rowiak LaserLabSolutions (Hannover, Allemagne) pour la réalisation de coupes histologiques avec des échantillons non décalcifiés. En effet, le processus de décalcification touchait de façon indistincte le tissu osseux et l'adhésif minéralisé, entraînant des difficultés d'interprétation par disparition de l'adhésif sur les coupes histologiques. L'absence de décalcification devrait permettre une analyse des rapports os-adhésif plus précis.

Les échantillons étaient déshydratés dans des solutions d'alcool de concentrations croissantes puis inclus dans du PMMA. Le bloc de PMMA était ensuite découpé au microtome

laser (TissueSurgeon, LLS Rowiak, Hannover, Allemagne) à une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$ . Les coupes étaient colorées par l'association d'hématoxyline et d'éosine.

L'analyse histologique était descriptive. Elle permettait d'analyser la réaction tissulaire vis-à-vis de l'adhésif ainsi que d'évaluer la consolidation osseuse histologique.

### 3.7.4 Modèle d'ostéotomie fibulaire

Le modèle d'ostéotomie fibulaire consistait en une fracture de la fibula du rat au niveau de sa fusion distale avec le tibia. Le tibia supporte les contraintes mécaniques de la jambe, tandis que la fibula, même au niveau de jonction, est grêle et ne supporte que de façon minimale les contraintes mécaniques de la jambe. Donc ce modèle d'ostéotomie fibulaire correspond cliniquement à un modèle de fracture avec contrainte mécanique faible. Il permet d'évaluer l'efficacité de l'adhésif dans de telles conditions.

L'intervention est réalisée de façon bilatérale. Les 12 rats, correspondant à 24 sites opératoires, étaient répartis en trois groupes (Figure 10) :

- Absence de fixation : N=2 sites opératoires respectivement à 5 et à 12 semaines
- Fixation par encollage par TTCP/OPS : N=5 sites opératoires respectivement à 5 et à 12 semaines
- Fixation par encollage par TTCP/OPS-nPDA : N=5 sites opératoires respectivement à 5 et à 12 semaines

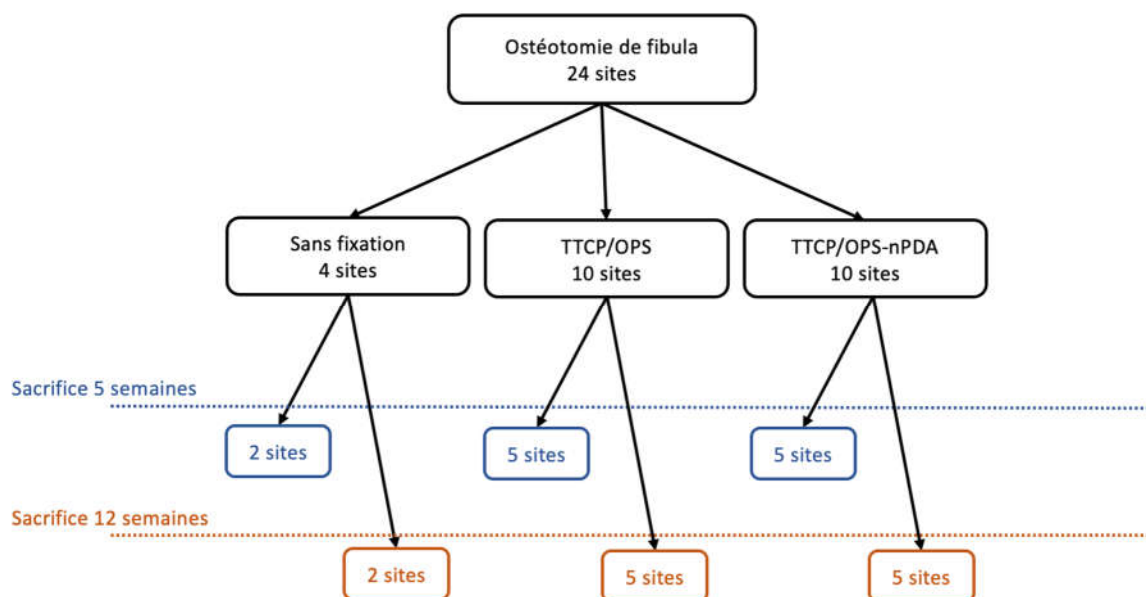
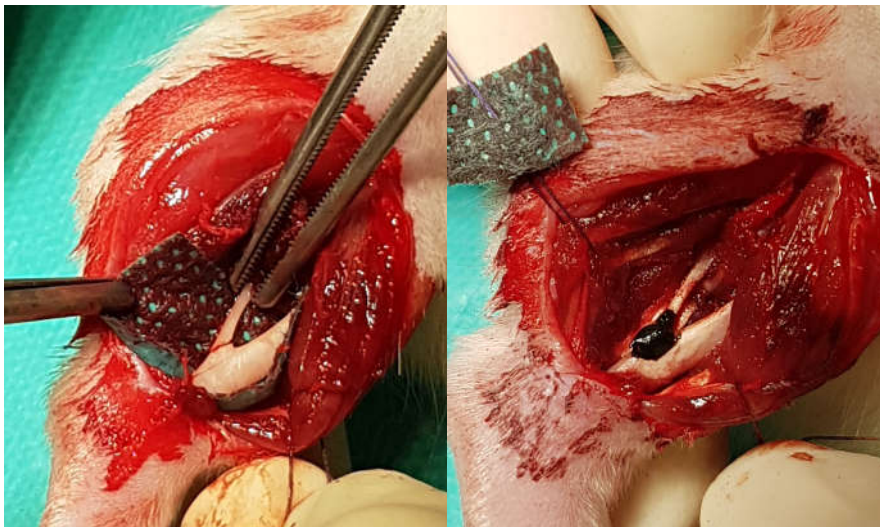


Figure 10 : Diagramme de flux du modèle de d'ostéotomie de fibula

### 3.7.4.1 Procédure chirurgicale

Les rats étaient installés en décubitus dorsal. La chirurgie était réalisée de façon bilatérale. Une incision cutanée de la jambe au bistouri froid était réalisée en regard de la loge musculaire latérale de la jambe. Cette loge était ensuite disséquée jusqu'à mettre en évidence la fibula, qui était ensuite totalement disséquée en sous-périosté. La fibula était fracturée par manœuvre instrumentale en distalité au niveau de la jonction tibio-fibulaire (Figure 11). Dans le groupe contrôle, aucune fixation n'était réalisée. Dans les groupes tests, l'encollage était réalisé par application de la colle au niveau des berges osseuses sous aspiration (Figure 11). La fracture était alors réduite et la réduction maintenue pendant 4 minutes.

La fermeture était réalisée en plusieurs plans : fermeture musculaire au Vicryl® 4/0 et sous-peau au Vicryl® 4/0. De la colle cutanée Dermabond® était ensuite appliqué sur la plaie pour éviter la section des fils et l'ouverture de la plaie par le rat lui-même.



**Figure 11 :** Photographies peropératoire d'une fibula fracturée au niveau de la jonction tibio-fibulaire (à gauche) et encollée par TTCP/OPS-nPDA (à droite)

### 3.7.4.2 Procédure d'euthanasie et évaluation clinique

Les rats étaient sacrifiés à 5 ou à 12 semaines selon la répartition indiquée dans la Figure 10.

Après induction par un mélange de dioxygène et d'isoflurane 5%, l'euthanasie était réalisée par injection intra-cardiaque de 0,3 mL/kg de T61®. La procédure de prélèvement comprenait d'abord une reprise de l'abord chirurgical, puis une dissection précautionneuse de la fibula, du tibia et de la jonction tibio-fibulaire. Le tibia était ensuite sectionné en distalité à la

scie circulaire. La section supérieure était réalisée au niveau de genou en intra-articulaire. Les échantillons explantés comprenaient donc la totalité de la fibula et de la jonction tibio-fibulaire.

Une évaluation macroscopique de la zone fracturée est réalisée à la recherche de signes d'inflammation ou d'infection. La tenue mécanique est évaluée par traction manuelle. Le succès clinique était défini comme une tenue mécanique lors de la mobilisation ainsi que l'absence de déplacement secondaire.

L'échantillon était ensuite fixé 24 heures dans de la formaline tamponnée neutre 10%.

#### 3.7.4.3 *Évaluation microtomodensitométrique*

L'acquisition  $\mu$ TDM était réalisée à l'aide du Skyscan<sup>®</sup> 1172 (Bruker microCT, Kontich, Belgique) avec des paramètres similaires à ceux de la section 3.7.2.3. Les coupes multiplanaires ont été reconstruites à l'aide du logiciel NRecon (Bruker micro CT, Kontich, Belgique).

Une évaluation qualitative observationnelle des images  $\mu$ TDM était réalisée afin de décrire la jonction fibula-adhésif-tibia : continuité entre les os et l'adhésif, présence d'un cal osseux, présence d'ostéolyse ou d'inflammation locale.

#### 3.7.4.4 *Évaluation histologique*

Les échantillons prélevés (immergés dans 70% d'éthanol) étaient envoyés à LLS Rowiak LaserLabSolutions (Hannover, Allemagne) pour la réalisation de coupes histologiques avec des échantillons non décalcifiés pour les mêmes raisons que les échantillons d'autogreffes. La méthode était identique à celle décrite dans la section 3.7.3.4. Les coupes, d'une épaisseur de 10  $\mu$ m, étaient colorées par l'association d'hématoxyline et d'éosine.

L'analyse histologique était descriptive. Elle permettait d'analyser la réaction tissulaire vis-à-vis de l'adhésif ainsi que d'évaluer la consolidation osseuse histologique.

### **3.8 Élaboration d'un adhésif biofonctionnalisé par chargement de ciprofloxacine sur les nanoparticules de polydopamine**

Les nPDA peuvent être fonctionnalisées avec diverses molécules afin d'ajouter des fonctions biologiques complémentaires à l'adhésif. La fonctionnalisation par la ciprofloxacine (CFX), un antibiotique, a été étudiée dans ce travail en raison de son efficacité dans le traitement des infections osseuses (207).

### **3.8.1 Chargement de la ciprofloxacine sur les nPDA et évaluation de la libération de la ciprofloxacine par l'adhésif**

Le chargement de CFX (chlorhydrate de ciprofloxacine, Bio Basic, Markham, Ontario, Canada) sur les nPDA, formant les nPDA-CFX, était réalisé par une méthode d'immersion : 100 mg de CFX était ajouté à 50 mL d'une suspension de nPDA à 1 mg/mL dans l'eau. Ce mélange était maintenu sous agitation modérée pendant 24 heures à température ambiante. Une centrifugation à 10000 g et 15°C pendant 20 minutes était réalisée à 5 reprises. Le surnageant après chaque centrifugation était analysé par spectroscopie UV à 271 nm afin de quantifier la concentration de CFX et déterminer ainsi indirectement le taux de chargement par la formule suivante :

$$\frac{(m_{\text{CFX Libre}} - m_{\text{CFX récupérée}})}{(m_{\text{nPDA}} + m_{\text{CFX Libre}} - m_{\text{CFX récupérée}})} \times 100$$

Le taux de chargement de la CFX sur les nPDA en suivant les procédures ci-dessus était de 20%. Les nPDA-CFX étaient congelées puis lyophilisées afin d'obtenir la poudre nPDA-CFX.

Des échantillons d'adhésif TTCP/OPS-nPDA-CFX (N=3) étaient préparés par pression manuelle de l'adhésif à l'état de pâte dans un moule en polytétrafluoroéthylène pour former des disques d'adhésif de 8 mm de diamètre et 2 mm de hauteur. La libération de la CFX des disques était étudiée dans de l'eau ultrapure sur un système automatisé pour les tests de libération dynamiques (708-DS dissolution apparatus, Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis d'Amérique) pendant 48 heures. La concentration en CFX dans chaque prélèvement a été mesurée automatiquement par spectroscopie UV à 271 nm.

### **3.8.2 Évaluation microbiologique de la fonctionnalisation à la ciprofloxacine de l'adhésif**

L'intérêt de l'ajout de CFX dans l'adhésif est d'apporter des propriétés antibactériennes. L'évaluation de l'effet antibactérien de l'adhésif fonctionnalisé à la CFX des nPDA a été réalisée en utilisant deux tests microbiologiques distincts : le test d'adhésion bactérienne et de croissance planctonique ainsi que le test de diffusion de Kirby-Bauer. Ces tests ont été réalisés sur des disques d'adhésif conçus de façon identique à ceux décrits précédemment (3.8.1).

Les deux faces des disques d'adhésif étaient désinfectées par rayonnement UV pendant 30 minutes préalablement au test microbiologique. Les propriétés antibactériennes de cinq types d'adhésifs étaient comparées :

- Disques de TTCP/OPS
- Disques de TTCP/OPS immergés (TTCP/OPS<sub>im</sub>) 1 minute dans une solution de CFX injectable à 200 mg/100 mL (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Allemagne) puis rincés rapidement au PBS
- Disques de TTCP/OPS-nPDA
- Disques de TTCP/OPS-nPDA immergés (TTCP/OPS-nPDA<sub>im</sub>) 1 minute dans une solution de CFX injectable à 200 mg/100 mL (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Allemagne) puis rincés rapidement au PBS
- Disques de TTCP/OPS-nPDA-CFX

### 3.8.2.1 Test d'adhésion bactérienne et de croissance planctonique

Les disques correspondant aux 5 groupes d'échantillons (N=3 chacun) étaient disposés dans une plaque 48 puits (Falcon<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Allemagne). Un volume de 400 µL d'une suspension de *Staphylococcus aureus* sous-espèce *aureus* Rosenbach ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>™</sup> (ATCC<sup>®</sup>, Manassas, Virginie, États-Unis d'Amérique) à la concentration de  $1 \times 10^6$  UFC (Unité Formant Colonie)/mL était ajouté dans chaque puit. Après une incubation de 24 heures ou de 48 heures à 37°C, les disques d'adhésif étaient retirés pour effectuer le test d'adhésion bactérienne tandis que la suspension bactérienne était analysée par le test de croissance planctonique.

Lors du test d'adhésion bactérienne, les disques, après incubation, étaient d'abord rincés dans 5 mL de PBS sous agitation pendant 30 s afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Ils étaient ensuite immergés dans un tube contenant 2 mL de PBS et placés dans un bain à ultrasons pendant 1 minute afin de détacher les bactéries ayant adhérees. Un volume de 0,1 mL de la solution provenant des tubes ainsi que des dilutions en série de cette solution de  $10^{-2}$  à  $10^{-6}$  étaient étalés sur des géloses Mueller-Hinton (MH), puis incubées pendant 24 heures à 37°C. Le nombre de bactéries vivantes ayant adhérees aux disques était déterminé par décompte des colonies.

Lors du test de croissance planctonique, 0,1 mL de la suspension bactérienne au contact des disques ainsi que des dilutions en série de cette solution de  $10^{-2}$  à  $10^{-6}$  étaient étalés sur des géloses MH, puis incubées pendant 24 heures à 37°C. Le nombre de bactéries vivantes n'ayant pas adhérees aux disques était déterminé par décompte des colonies.

### 3.8.2.2 Test de diffusion de Kirby-Bauer

Les disques correspondant aux 5 groupes d'échantillons (N=3 chacun) étaient placés sur des géloses MH sur lesquelles 0,1 mL d'une suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus* sous-espèce *aureus* Rosenbach ATCC® 6538™ à la concentration de  $1 \times 10^4$  UFC/mL avait été étalée au préalable. Après une incubation de 24 heures à 37°C, le diamètre des zones d'inhibition autour des disques était mesuré de façon quotidienne pendant 1 mois. Chaque jour, les mêmes disques étaient transférés sur de nouvelles géloses MH avec ensemencement de *Staphylococcus aureus*.

## 3.9 Statistiques

Les analyses statistiques à la recherche de différences statistiquement significatives ont été réalisées sur le site BiostaTGV (<https://biostatgv.sentiweb.fr>) développé par l'Institut Pierre Louis d'Épidémiologie et de Santé Publique affilié à l'Inserm et à Sorbonne Université. Le test utilisé était le test non-paramétrique de Mann-Whitney. Le risque  $\alpha$  était défini à 5%.



## **4. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

---

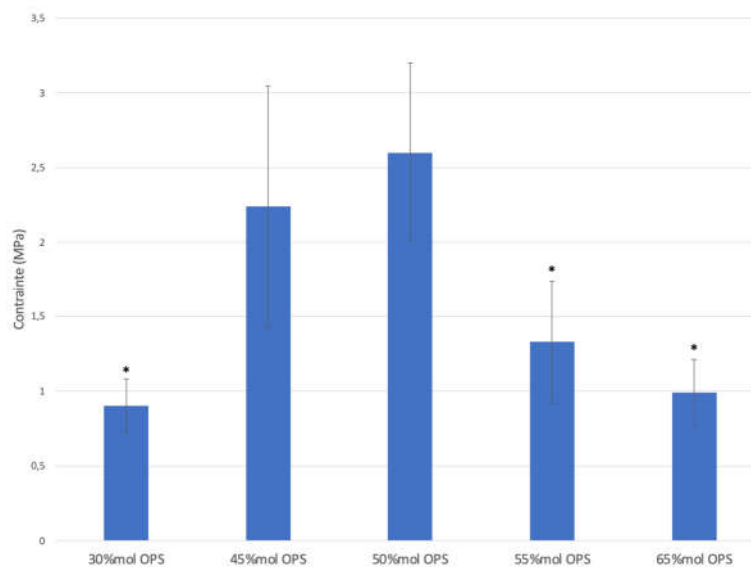


## 4.1 Optimisation de la formulation de l'adhésif

### 4.1.1 Tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale d'échantillons en titane collés : criblage et optimisation de la formulation de l'adhésif

La formulation optimale de l'adhésif, c'est-à-dire celle présentant l'adhésion la plus élevée lors de tests mécaniques en traction uniaxiale sur des échantillons en titane, était recherchée en faisant varier le pourcentage molaire (%<sub>mol</sub>) d'OPS dans le mélange TTCP/OPS, le ratio liquide/poudre (mL/g) et le pourcentage massique (%<sub>wt</sub>) de nPDA dans l'adhésif TTCP/OPS-nPDA.

Tout d'abord, le pourcentage molaire d'OPS dans le mélange TTCP/OPS associé à la meilleure adhésion ( $2,6 \pm 0,6$  MPa) était retrouvé à 50%<sub>mol</sub> OPS, comme démontré dans la Figure 12. Lorsque ce pourcentage augmentait, l'adhésion diminuait progressivement de  $1,33 \pm 0,41$  MPa ( $p=0,0019$ ) pour 55%<sub>mol</sub> OPS jusqu'à  $0,9 \pm 0,18$  MPa ( $p=0,0009$ ) pour 65%<sub>mol</sub> OPS. De façon similaire, quand il diminuait, l'adhésion diminuait progressivement de  $2,24 \pm 0,81$  MPa ( $p=0,293$ ) pour 45%<sub>mol</sub> OPS jusqu'à  $0,99 \pm 0,22$  MPa ( $p=0,015$ ) pour 30%<sub>mol</sub> OPS. Ces résultats sont en accord avec la littérature antérieure (17) évaluant la composition des adhésifs organo-minéraux.



**Figure 12 :** Tests mécaniques en traction uniaxiale sur échantillon en titane évaluant l'effet du pourcentage molaire (%<sub>mol</sub>) d'OPS dans le mélange TTCP/OPS sur l'adhésion après 1 heure d'immersion dans un bain de PBS à 37°C. \* signifie différence statistiquement significative en comparaison avec le groupe « 50%<sub>mol</sub> OPS »

Ensuite, comme démontré dans la Figure 13, le ratio liquide/poudre optimal pour le mélange TTCP/OPS était celui de 0,21 mL/g avec une adhésion à  $1,9 \pm 0,51$  MPa (Figure 13).

Lorsque ce ratio liquide/poudre augmentait (à 0,25 mL/g) ou diminuait (à 0,17 mL/g), l'adhésion diminuait significativement à  $1,13 \pm 0,22$  MPa ( $p=0,016$ ) ou perdait complètement ses propriétés adhésives (aucune valeur enregistrée par l'extensomètre). Ces résultats sont aussi en accord avec la littérature antérieure (16,40) évaluant les propriétés des adhésifs TTCP/OPS (Tetranite®). Mais, le ratio liquide/poudre optimal semble dépendre du type de CPC utilisé, en effet, le ratio optimal était de 0,15 mL/g dans une étude (17) évaluant un adhésif  $\alpha$ TCP/OPS (OsStic™). Cette différence s'explique par la réactivité variable des différents CPC, l' $\alpha$ TCP est connu pour être particulièrement réactif en milieu aqueux en raison d'une haute énergie spécifique (196), nécessitant ainsi un volume de liquide moindre pour la prise.

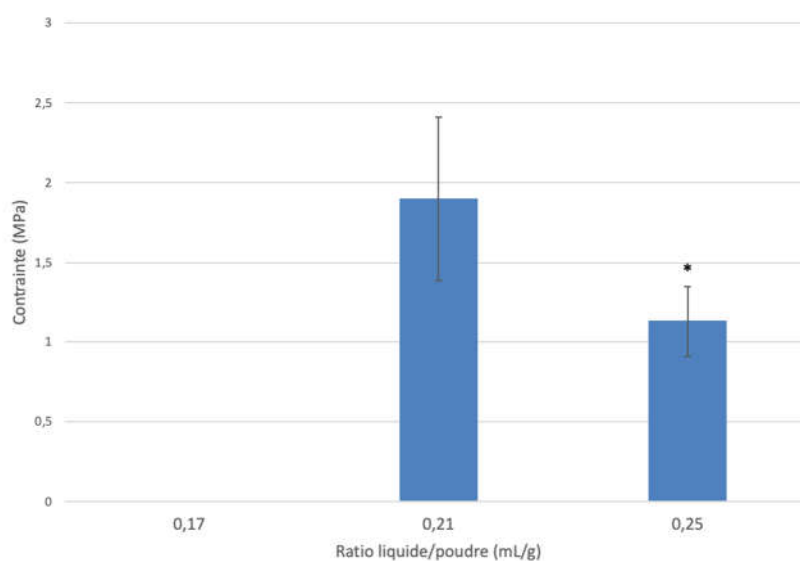


Figure 13 : Tests mécaniques en traction uniaxiale sur échantillon en titane évaluant l'effet du ratio liquide/poudre (mL/g) sur l'adhésion après 1 heure d'immersion dans un bain de PBS à 37°C. \* signifie différence statistiquement significative ( $p=0,016$ ) en comparaison avec le groupe « ratio liquide/poudre à 0,21 mL/g »

Afin d'augmenter les capacités adhésives du mélange 50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS, des nPDA étaient ajoutées nPDA (Figure 14). Le pourcentage massique (%<sub>wt</sub>) optimal de nPDA était retrouvé à 2%<sub>wt</sub> pour une adhésion à  $3,32 \pm 0,68$  MPa, qui avait une tendance à la supériorité par rapport à celle retrouvée avec les formulations contenant 0%<sub>wt</sub> ( $2,6 \pm 0,6$  MPa,  $p=0,08$ ), 5%<sub>wt</sub> ( $2,36 \pm 0,48$  MPa,  $p=0,013$ ) et 10%<sub>wt</sub> ( $2,72 \pm 0,58$  MPa,  $p=0,15$ ), toutefois sans significativité statistique en raison du fort écart-type.

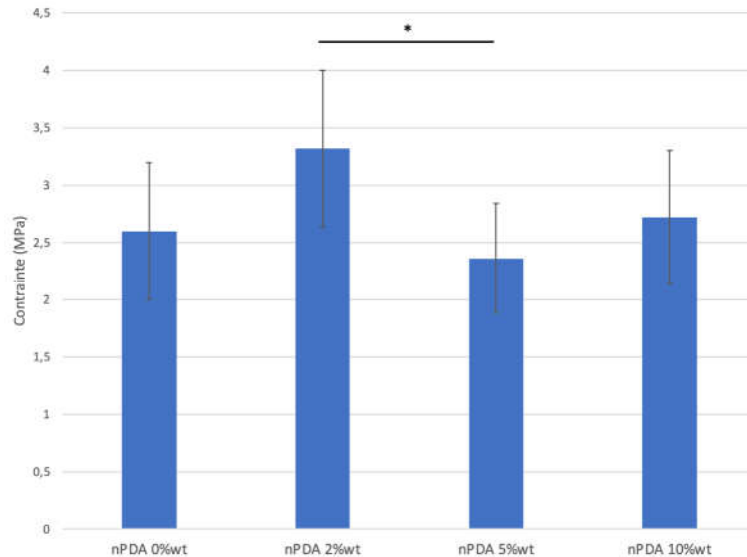


Figure 13 : Tests mécaniques en traction uniaxiale sur échantillon en titane évaluant l'effet du pourcentage massique (%wt) de nPDA sur l'adhésion après 1 heure d'immersion dans un bain de PBS à 37°C. \* signifie différence statistiquement significative ( $p=0,013$ ) entre les groupes indiqués

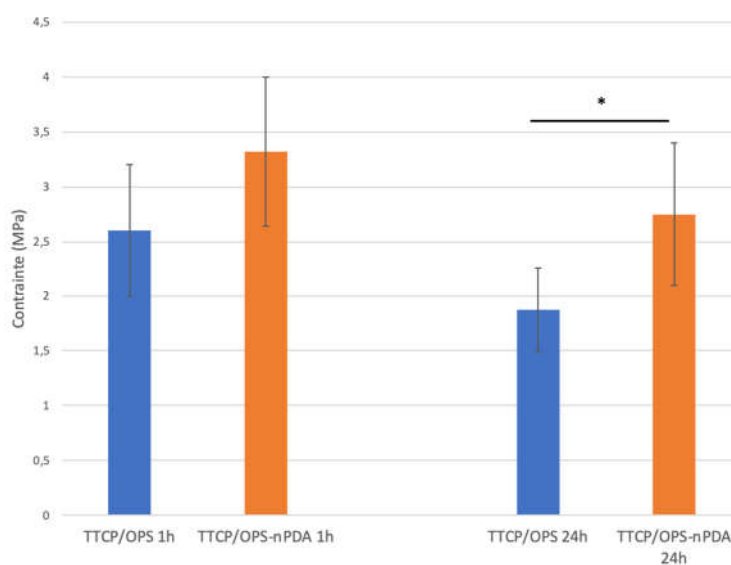
D'après ces résultats, la formulation comprenant 50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS-2%<sub>wt</sub>nPDA, en appliquant un ratio liquide/poudre de 0,21mL/g, était retenue comme la formulation optimale de l'adhésif en raison de ses capacités d'adhésion supérieures. Cette formulation sera utilisée lors de la suite de ce travail en comparaison avec la formulation 50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS.

#### 4.1.2 Effet du temps d'immersion sur l'adhésion de l'adhésif optimisé

Les conditions physiologiques qui seront appliquées à l'adhésif lors de son utilisation future intracorporelle sont un milieu aqueux et une homéothermie à 37°C. En immergeant des échantillons de titane collés dans un bain de PBS pendant des durées variables, l'effet du milieu aqueux était évalué par des tests mécaniques en traction uniaxiale sur ces échantillons, comme démontré sur la Figure 14. L'adhésion diminuait de façon significative ( $p=0,012$ ) entre 1 et 24 heures d'immersion dans le groupe TTCP/OPS ( $2,6 \pm 0,6$  MPa *versus*  $1,87 \pm 0,39$  MPa respectivement). L'étude de l'évolution des propriétés adhésives vis-à-vis du titane dans un milieu aqueux n'est pas décrite dans la littérature des adhésifs organo-minéraux puisque les autres études similaires ont évalué l'adhésion après une durée d'immersion unique de 24 heures (17) ou de 48 heures (16), sans évaluation précoce à 1 heure. Toutefois, une étude, consistant en un modèle *ex vivo* d'extraction d'un bouchon d'os dans des fémurs humains collés avec de l'OsStic™ (186), compare des résultats précoces, mais à 2 heures d'immersion, avec ceux à 24 heures d'immersion. Aucune différence significative entre 2 et 24 heures d'immersion n'était alors retrouvée. Cette étude diffère par le temps d'observation, la

composition de l'adhésif et le matériau collée de la méthodologie utilisée, limitant la comparabilité.

Dans le groupe TTCP/OPS-nPDA, il était retrouvé une tendance non significative à la diminution de l'adhésion ( $p=0,06$ ) entre 1 et 24 heures ( $3,32 \pm 0,68$  MPa *versus*  $2,75 \pm 0,65$  MPa respectivement). Néanmoins, l'ajout de nPDA permet de conserver les propriétés adhésives en milieu aqueux lors d'une immersion prolongée pendant 24 heures. En effet, l'adhésif comprenant 2%<sub>wt</sub>nPDA (50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS-2%<sub>wt</sub>nPDA) semblait présenter une adhésion au titane supérieure ( $p=0,083$ ) à la formulation sans nPDA (50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS) après 1 heure d'immersion dans un bain de PBS :  $3,32 \pm 0,68$  MPa *versus*  $2,6 \pm 0,6$  MPa respectivement. Cette tendance était confirmée après 24 heures d'immersion dans un bain de PBS : l'adhésif TTCP/OPS-nPDA présentait une adhésion ( $2,75 \pm 0,65$  MPa) significativement supérieure ( $p=0,0029$ ) à l'adhésif TTCP/OPS ( $1,87 \pm 0,39$  MPa). Cette étude démontre les meilleures capacités adhésives au long cours de l'adhésif comprenant des nPDA.



**Figure 14 :** Tests mécaniques en traction uniaxiale sur échantillon en titane étudiant l'effet du milieu aqueux (par immersion dans un bain de PBS à 37°C pendant 1 ou 24 heures) sur l'adhésion des adhésifs TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA. \* signifie différence statistiquement significative ( $p=0,029$ ) entre les groupes indiqués

L'examen des surfaces après rupture de l'adhésion (Figure 15) montrait un faciès de rupture de type cohésif, au sein de l'adhésif lui-même (les ruptures cohésives décrites dans ce travail sont toujours au sein de l'adhésif), en accord avec la littérature antérieure au sujet des adhésifs organo-minéraux (16,17). Cela signifie que les interactions adhésives, c'est-à-dire entre l'adhésif et la surface en titane, sont supérieures aux forces cohésives, c'est-à-dire

les interactions à l'intérieur de l'adhésif lui-même. La rupture a donc lieu au sein de l'adhésif dont la structure minérale est responsable d'une absence de ductilité. Ce profil de rupture est un signe de bonnes propriétés adhésives.

Pour résumer, l'adhésif TTCP/OPS-nPDA présentait des capacités adhésives envers le titane supérieures à l'adhésif TTCP/OPS après 24 heures d'immersion dans un environnement aqueux à 37°C.



Figure 15 : Faciès de rupture d'un collage d'échantillons en titane par TTCP/OPS à gauche et TTCP/OPS-nPDA à droite après 24 heures d'immersion dans un bain de PBS à 37°C montrant un mode de rupture cohésif

## 4.2 Caractérisation de l'adhésif optimisé

### 4.2.1 Caractérisation de l'adhésion à l'os : tests mécaniques instrumentaux en traction uniaxiale ex vivo d'échantillons d'os bovins collés

La Figure 16 montre les résultats de la comparaison des deux formulations (TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA) par des tests de traction uniaxiale *ex vivo* sur des échantillons en forme de cuboïdes d'os bovin après 1 et 24 heures d'immersion dans un bain de PBS à 37°C. Ces résultats étaient similaires à ceux retrouvés avec les échantillons en titane (Figure 13). En effet, l'adhésif TTCP/OPS-nPDA présentait une adhésion à tendance supérieure au TTCP/OPS après 1 heure d'immersion dans le PBS ( $1,21 \pm 0,39$  MPa *versus*  $0,95 \pm 0,3$  MPa respectivement,  $p=0,247$ ). Cette supériorité était confirmée après 24 heures d'immersion dans le PBS ( $1,28 \pm 0,26$  MPa *versus*  $0,7 \pm 0,14$  MPa respectivement,  $p=0,00093$ ). Quant à l'impact de la durée d'immersion dans le PBS, l'adhésion semblait diminuer pour l'adhésif TTCP/OPS entre 1 heure et 24 heures d'immersion ( $0,95 \pm 0,3$  MPa *versus*  $0,7 \pm 0,14$  MPa respectivement,  $p=0,115$ ) alors qu'à l'inverse, elle semblait augmenter pour l'adhésif TTCP/OPS-nPDA ( $1,21 \pm 0,39$  MPa *versus*  $1,28 \pm 0,26$  MPa,  $p=0,674$ ), suggérant à nouveau de meilleures performances adhésives pour le TTCP/OPS-nPDA. L'ajout de nPDA semble donc améliorer la cohésion de l'adhésif en milieu aqueux.

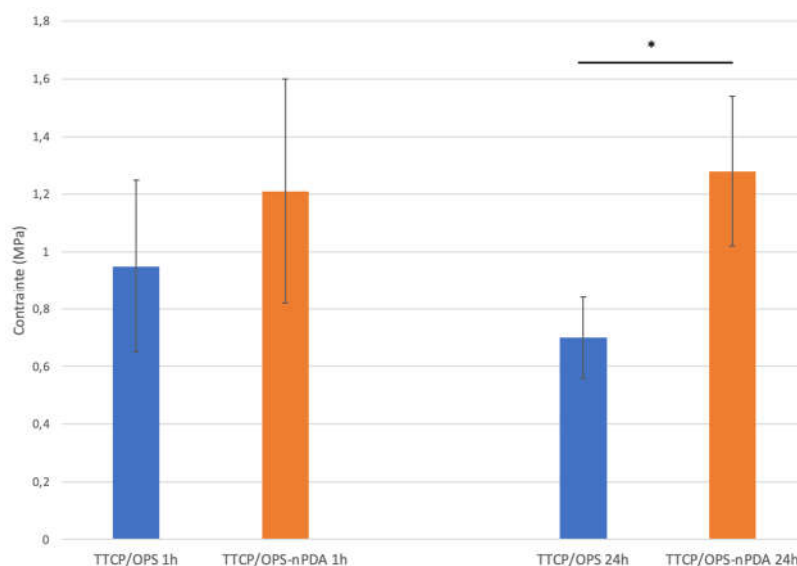


Figure 16 : Tests mécaniques en traction uniaxiale *ex vivo* d'échantillons en os cortical bovin collés après 1 heure et 24 heures d'immersion dans un bain de PBS à 37°C comparant l'adhésif TTCP/OPS avec le TTCP/OPS-nPDA. \* signifie différence statistiquement significative ( $p=0,00093$ ) entre les groupes indiqués

L'examen des surfaces après rupture (Figure 17) retrouvait un faciès de rupture principalement cohésif, de façon similaire à ce qui était observé avec les échantillons en titane.

Les valeurs de rupture de l'adhésion étaient supérieures lors des tests avec des échantillons en titane par rapport à ceux avec des échantillons en os bovin pour chaque formulation d'adhésif. Une affinité de l'adhésif plus importante vis-à-vis du titane pourrait expliquer ces résultats. Ce constat est corroboré par les résultats déjà publiés au sujet du Tetranite® (16) : la rupture de l'adhésion était mesurée à 2 MPa environ pour les échantillons osseux corticaux et 3 MPa pour les échantillons en titane (avec une surface polie) après une immersion de 48 heures à 37°C. Cet écart est légèrement inférieur à celui retrouvé dans ce travail :  $1,28 \pm 0,26$  MPa environ pour les échantillons osseux corticaux et  $2,75 \pm 0,65$  MPa pour les échantillons en titane après une immersion de 24 heures à 37°C. De plus, la congruence des surfaces joue probablement aussi un certain rôle. En effet, les surfaces usinées des échantillons en titane présentaient une congruence supérieure entre elles que celles des échantillons biologiques en os bovin.

Pour résumer, l'adhésif TTCP/OPS-nPDA présentait de meilleures capacités adhésives avec l'os cortical en comparaison avec le TTCP/OPS. Ces résultats confirmaient les résultats obtenus avec les échantillons en titane. De plus, l'intérêt des nPDA semble plus important avec les échantillons osseux puisque l'adhésion a tendance à augmenter entre 1 heure et 24 heures dans un environnement aqueux à 37°C contrairement à l'adhésif TTCP/OPS.

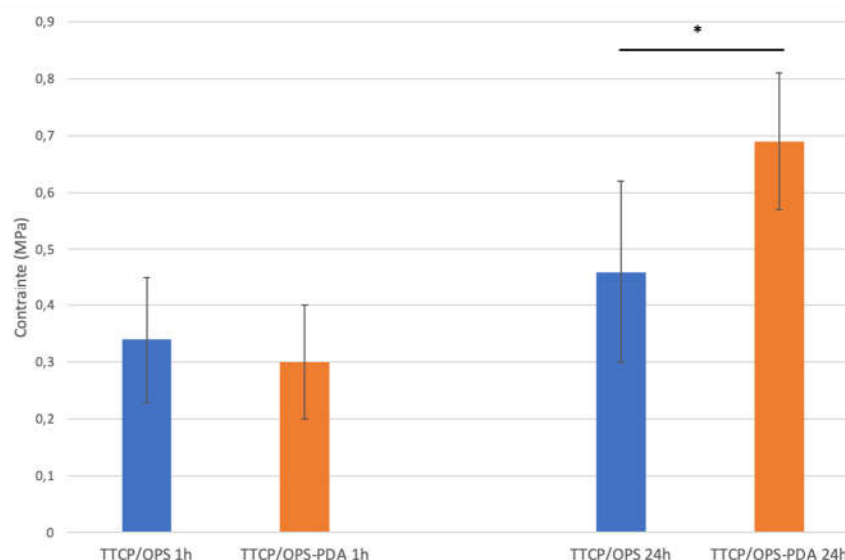


Figure 17 : Faciès de rupture d'un collage d'échantillons en titane par TTCP/OPS à gauche et TTCP/OPS-nPDA à droite après 24 heures d'immersion dans un bain de PBS à 37°C montrant un mode de rupture cohésif

#### 4.2.2 Caractérisation de l'adhésion à l'os : tests mécaniques manuels en traction *ex vivo* d'un encollage de fibula sur un tibia de rat

Le modèle *ex vivo* d'encollage de fibula sur un tibia de rat, avec évaluation de l'adhésion par des tests mécaniques manuels en traction, imite la situation clinique de fixation d'autogreffe, réalisée de façon courante pour reconstruire des pertes de substance osseuse. Ces tests, comme démontré dans la Figure 18, ne mettent pas en évidence de différence dans les capacités adhésives des deux formulations après 1 heure d'immersion dans un bain de PBS à 37°C ( $0,3 \pm 0,1$  MPa pour TTCP/OPS-nPDA *versus*  $0,34 \pm 0,11$  MPa pour TTCP/OPS,  $p=0,522$ ). Toutefois, après 24 heures d'immersion, l'adhésion augmentait à la fois pour le TTCP/OPS ( $p=0,335$ ) et pour le TTCP/OPS-nPDA ( $p=0,0021$ ), ce dernier devenant significativement supérieur ( $p=0,029$ ) au TTCP/OPS ( $0,69 \pm 0,12$  MPa *versus*  $0,46 \pm 0,16$  MPa respectivement). L'examen des surfaces après rupture montrait un faciès de rupture mixte, non seulement cohésif (en raison de l'absence de ductilité du TTCP), mais aussi adhésif probablement en raison de la plus faible congruence entre les surfaces collées par rapport aux cylindres en titane ou cuboïdes d'os bovin testés précédemment.

Ces résultats sont globalement en accord avec les résultats antérieurs obtenus lors des tests *ex vivo* sur les cuboïdes d'os bovins. Toutefois, ce modèle est plus proche des conditions cliniques que les tests instrumentaux sur l'os bovin. Il permet, à nouveau, de confirmer la pertinence de la formulation TTCP/OPS-nPDA.



**Figure 18 :** Tests mécaniques manuels en traction *ex vivo* sur des encollages de fibula sur tibia de rat nPDA après 1 heure et 24 heures d'immersion dans un bain de PBS à 37°C comparant l'adhésif TTCP/OPS avec le TTCP/OPS-nPDA. \* signifie différence statistiquement significative ( $p=0,0029$ ) entre les groupes indiqués

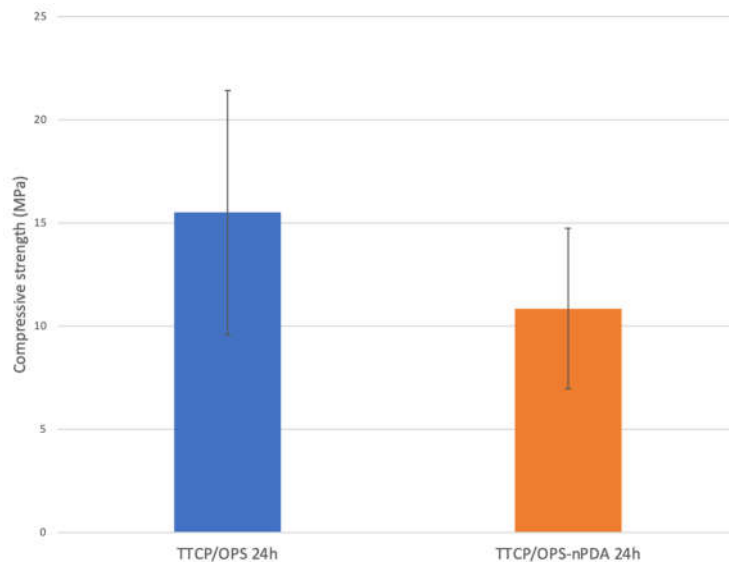
En conclusion, les résultats *in vitro* et *ex vivo* ont démontrés qu'après 24 heures en conditions physiologiques simulées (bain de PBS à 37°C) l'adhésif de formulation optimale (50%<sub>mol</sub>TTCP/50%<sub>mol</sub>OPS-2%<sub>wt</sub>nPDA) présentait une adhésion statistiquement supérieure à l'adhésif sans nPDA.

#### 4.2.3 Caractérisation de la cohésion de l'adhésif : tests mécaniques en compression

Les tests mécaniques en compression de l'adhésif permettent d'évaluer sa cohésion interne. Les résultats, présentés dans la Figure 19, ne montraient pas de différence statistiquement significative ( $p=0,083$ ) entre les formulations TTCP/OPS ( $15,5 \pm 5,91$  MPa) et TTCP/OPS-nPDA ( $10,85 \pm 3,88$  MPa). Les nPDA ne semblent pas affecter la résistance en compression de l'adhésif. Toutefois, Liu *et al.* (29) retrouvaient une augmentation de la résistance en compression d'un ciment phospho-calcique (composé de 58%<sub>wt</sub> d' $\alpha$ TCP, de 25%<sub>wt</sub> de dicalcium phosphate dihydraté, de 8,5%<sub>wt</sub> d'hydroxyapatite et de 8,5%<sub>wt</sub> de carbonate de calcium) lorsqu'il était ajouté de la PDA (sous forme de polymère et non de nanoparticules). Toutefois, la comparaison avec le ciment de Liu *et al.* est limitée. En effet, les différences dans les réactions chimiques entre ce CPC/PDA et l'adhésif TTCP/OPS-nPDA, en raison de l'absence d'OPS, peuvent expliquer la différence de comportement en compression.

Pour améliorer la résistance aux charges mécaniques en compression, il convient d'augmenter la cohésion de l'adhésif. En effet, les céramiques présentent une absence de

ductilité permettant la propagation de microfissures qui pourront évoluer en fractures de l'adhésif lors de stress mécanique. Dans la littérature, le renforcement de la cohésion d'un adhésif organo-minéral peut être obtenu en ajoutant des fibres qui empêcheront la propagation de ces microfissures. Par exemple, l'ajout au Tetranite® de polymères dégradables comme les fibres de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), le lactate de chitosan ou les sutures en PLGA de type Vicryl® a été évalué (40). L'ajout notamment de fibres de PLGA à 14%<sub>vol</sub> a permis d'augmenter la résistance en compression de 42% ( $39 \pm 7$  MPa à  $67 \pm 14$  MPa), mais a réduit l'adhésion de deux échantillons en titane collé de 55% ( $3,9 \pm 2,4$  MPa à  $1,8 \pm 0,8$  MPa). Par conséquent, en s'inspirant de ces résultats, l'adhésif TTCP/OPS-nPDA pourrait être ultérieurement modifié de cette façon dans le but d'améliorer la résistance en compression et à la fatigue tout en minimisant l'effet négatif sur l'adhésion.



**Figure 19 :** Tests mécaniques en compression sur des échantillons cylindriques d'adhésif après 24 heures d'immersion dans un bain de PBS à 37°C comparant l'adhésif TTCP/OPS avec le TTCP/OPS-nPDA ( $p=0,083$ )

#### 4.2.4 Caractérisation du temps de travail : mesure du temps de prise

Le temps de prise doit être évalué pour définir le temps de travail disponible entre le début de la réaction chimique générant l'adhésif et la prise finale interdisant toute modification ou manipulation des fragments à coller. Il n'était pas retrouvé de différence significative de durée pour la prise initiale ( $p=0,08$ ), ni pour la prise finale ( $p=0,08$ ), entre les adhésifs

TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA (Figure 20). La prise initiale était mesurée à  $125 \pm 6$  s pour l'adhésif TTCP/OPS *versus*  $110 \pm 8$  s pour l'adhésif TTCP/OPS-nPDA. La prise finale était mesurée à  $221 \pm 10$  s pour l'adhésif TTCP/OPS *versus*  $180 \pm 1$  s pour l'adhésif TTCP/OPS-nPDA.

Dans le cadre d'une utilisation clinique de l'adhésif, il est nécessaire de disposer d'assez de temps pour appliquer la colle mais aussi pour placer correctement les fragments osseux afin de réduire en position anatomique. Si la prise est trop longue, la réduction devient difficile à maintenir en raison du durcissement tardif. De plus, une nouvelle méthode de fixation ne devrait pas être plus lente que celle utilisée actuellement puisque l'allongement de la durée opératoire réduit l'attirance des chirurgiens au produit et augmente le risque de complications postopératoires (208,209). La norme ISO 5833 considère un adhésif comme acceptable si la prise initiale n'excède pas quelques minutes et que la prise finale dure moins de 10 minutes (10,193). Le temps de prise de la colle TTCP/OPS avec ou sans nPDA est donc adapté à une utilisation clinique ultérieure : il permettrait l'application de la colle et la réduction des fragments osseux tout en étant suffisamment rapide en comparaison avec les moyens de fixation actuels.

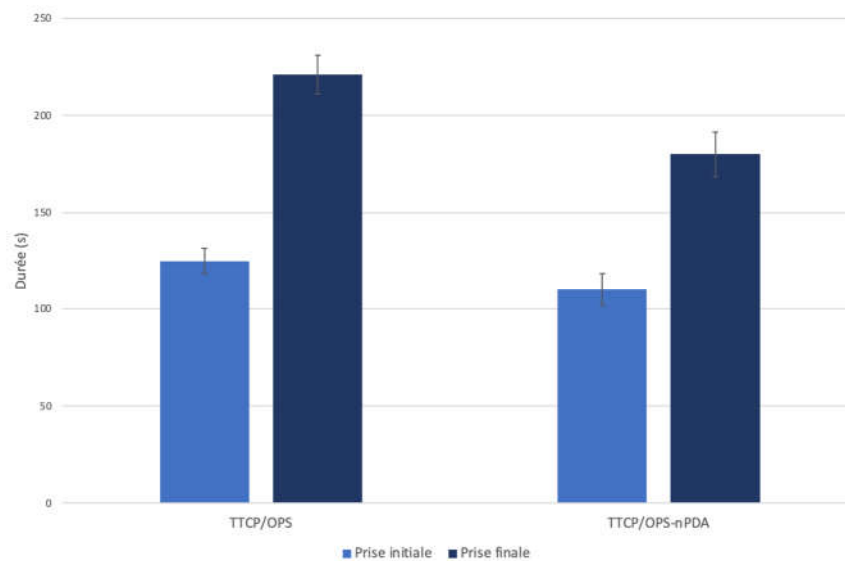


Figure 20 : Temps de prise de disques d'adhésif composés de TTCP/OPS ou de TTCP/OPS-nPDA

#### 4.2.5 Caractérisation des capacités de minéralisation : test au fluide corporel simulé

Le test au fluide corporel simulé (SBF) reproduit *in vitro* la minéralisation biomimétique de la surface des matériaux (formation d'une couche d'apatite semblable à l'os) retrouvée *in vivo* lors de l'implantation de matériau bioactif au niveau du tissu osseux. Ce test est donc prédictif du comportement d'un matériau envers le tissu osseux. La morphologie de surface

des disques de TTCP/OPS et de TTCP/OPS-nPDA immergés pendant 4 ou 7 jours dans le SBF à 37°C était évaluée par microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 21). Après 4 jours d'immersion dans le SBF, les surfaces des disques de TTCP/OPS-nPDA étaient largement recouvertes par une apatite ressemblant à l'os tandis qu'il n'était observé que de rares îlots d'apatite sur les disques de TTCP/OPS. Après 7 jours d'immersion dans le SBF, les disques de TTCP/OPS étaient finalement recouverts d'une fine couche d'apatite sur la plus grande partie de leur surface, alors que les disques de TTCP/OPS-nPDA étaient couverts par une abondante couche d'apatite. L'identification de cette couche minéralisée a été réalisée par diffraction aux rayons X (DRX) comme présenté sur la Figure 22. En effet, la minéralisation de surface a entraîné la disparition de deux pics caractéristiques du TTCP à  $\theta = 28-29$  degrés et l'apparition du pic caractéristique de l'hydroxyapatite à  $\theta = 32^\circ$  (210,211), confirmant ainsi que la substance minérale correspondait bien à de l'hydroxyapatite.

Par conséquent, en immergeant les échantillons dans le SBF, une couche d'hydroxyapatite se formait sur les surfaces des deux adhésifs. Les images MEB montraient de façon claire que la formation de la couche minéralisée débutait plus tôt et de façon plus abondante sur l'adhésif comprenant des nPDA. Ce résultat peut être lié à l'effet « *PDA-assisted hydroxyapatite formation* » qui permet la concentration des ions calciums à l'interface et promeut la nucléation de l'apatite (26). Cette rapide et abondante minéralisation constitue un signe prédictif de bioactivité envers le tissu osseux permettant à l'adhésif de créer des liaisons avec le tissu osseux.

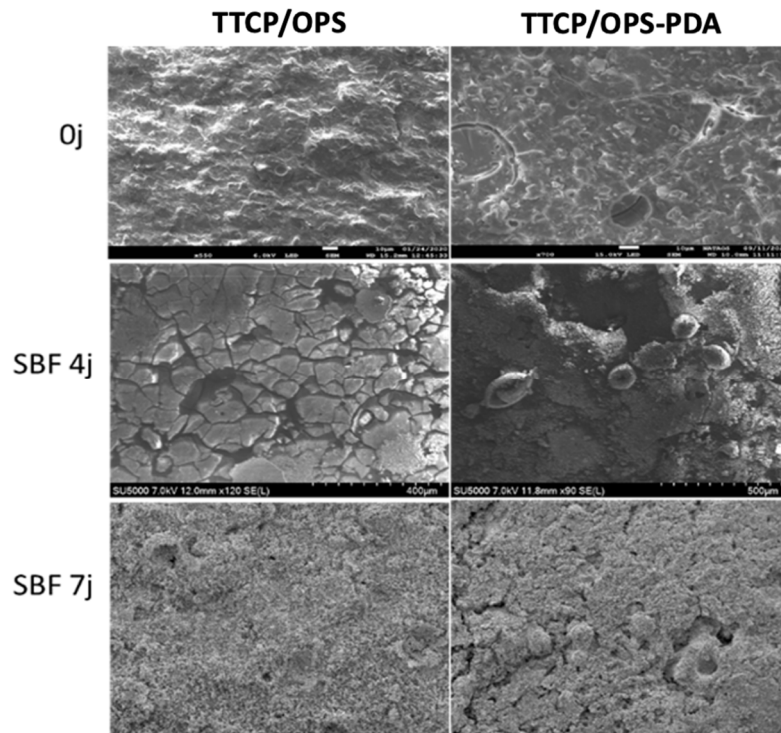


Figure 21 : Test de biominéralisation réalisé sur des disques d'adhésif TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA. Il est visualisé la couverture de la surface du disque TTCP/OPS-nPDA après 4 jours d'immersion dans le SBF à 37°C par une couche d'apatite tandis que quelques taches seulement d'apatite étaient présentes sur le disque TTCP/OPS. Après 7 jours d'immersion dans le SBF, cette couche d'apatite était épaisse sur la surface des disques TTCP/OPS-nPDA alors qu'elle ne couvrait pas la totalité de la surface des disques TTCP/OPS.

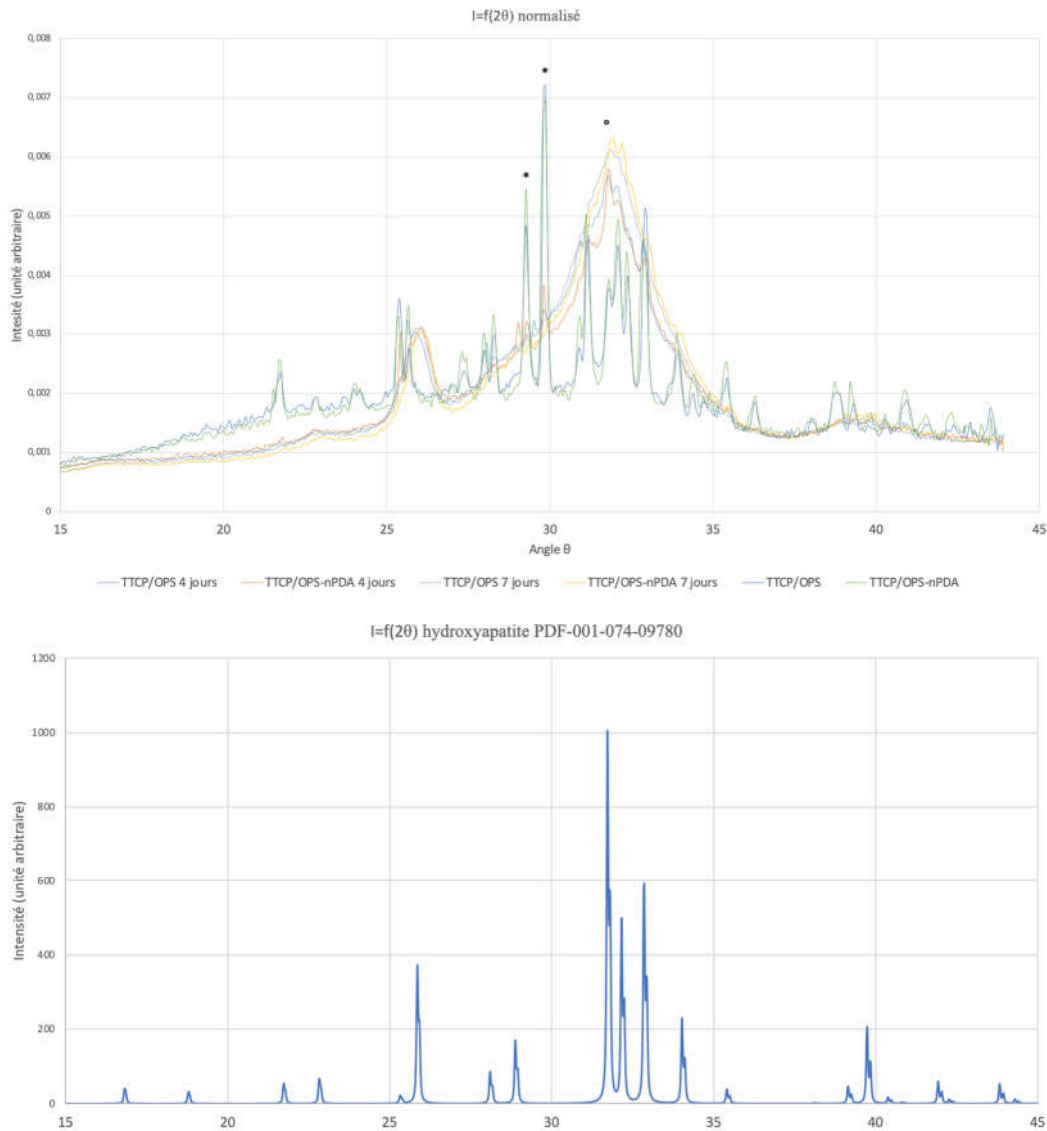


Figure 22 : Analyse par diffraction aux rayons X de la surface des disques de TTCP/OPS et de TTCP/OPS-nPDA après 0, 4 et 7 jours d'immersion dans le SBF (image du haut) montrant un profil DRX correspondant à de l'hydroxyapatite (image du bas) sur les échantillons immergés dans le SBF (\* pour les pics caractéristiques du TTCP et ° pour le pic caractéristique de l'hydroxyapatite)

### 4.3 Impact de la stérilisation sur les propriétés de l'adhésif optimisé

La stérilisation est une étape critique dans le développement et la manufacture d'un dispositif médical avant son utilisation clinique, pourtant, les effets des processus de stérilisation sur la sécurité et l'efficacité de ces dispositifs sont souvent ignorés. En effet, l'alkylation des groupements actifs du matériau par l'oxyde d'éthylène (OE) comme la haute énergie des rayons  $\gamma$  peuvent affecter les propriétés mécaniques et/ou biologiques des matériaux.

### 4.3.1 Impact sur les propriétés mécaniques de l'adhésif

L'effet de la méthode de stérilisation sur les propriétés adhésives a été étudié par des tests en traction uniaxiale sur des échantillons en titane collés. L'adhésion était significativement diminuée après traitement par OE comparativement aux adhésifs non-stériles (Figure 23) : dans le cas du TTCP/OPS de  $2,60 \pm 0,60$  MPa à  $1,83 \pm 0,56$  MPa ( $p=0,0281$ ) et dans celui du TTCP/OPS-nPDA de  $3,32 \pm 0,68$  MPa à  $2,06 \pm 0,35$  MPa ( $p=0,0003$ ) (Figure 23). Après irradiation aux rayons  $\gamma$ , une tendance similaire à la baisse de l'adhésion comparativement aux adhésifs non-stériles était aussi retrouvée mais sans significativité statistique : dans le cas du TTCP/OPS de  $2,60 \pm 0,60$  MPa à  $2,06 \pm 0,57$  MPa ( $p=0,065$ ) et dans celui du TTCP/OPS-nPDA de  $3,20 \pm 0,68$  MPa à  $2,66 \pm 0,84$  MPa ( $p=0,083$ ).

La stérilisation par OE a donc un impact négatif sur les propriétés de l'adhésif puisqu'elle entraîne une baisse de ses capacités adhésives, tandis que l'irradiation aux rayons  $\gamma$  a un impact plus faible sur les propriétés mécaniques de l'adhésif. De plus, l'OE peut laisser des résidus dans les pores des ciments phospho-calciques qui peuvent entraîner une toxicité cellulaire (212), ce qui n'est pas le cas de l'irradiation aux rayons  $\gamma$ . Ce constat est en accord avec les données de la littérature, la stérilisation par irradiation aux rayons  $\gamma$  est la méthode la plus adaptée et la plus utilisée pour stériliser des ciments phospho-calciques (196).

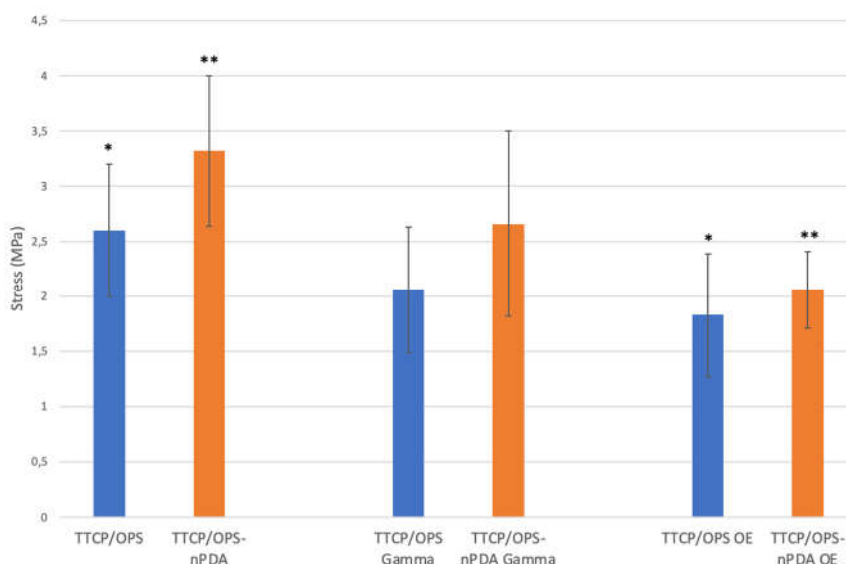


Figure 23 : Tests mécaniques en traction uniaxiale sur échantillon en titane après 1 heure d'immersion dans un bain de PBS à 37°C comparant les adhésifs TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA non stériles avec ceux irradiés aux rayons  $\gamma$  ou ceux traités par oxyde d'éthylène. \* et \*\* signifient différence statistiquement significative ( $p=0,0281$  et  $p=0,0003$  respectivement) entre les groupes marqués par des symboles identiques

#### 4.3.2 Évaluation de l'efficacité de la méthode de stérilisation

L'évaluation microbiologique ne retrouvait pas de croissance bactérienne après 21 jours d'incubation dans le bouillon cœur-cervelle (BCC) pour les poudres irradiées aux rayons  $\gamma$ , démontrant ainsi la stérilisation effective des poudres constituant l'adhésif. A l'inverse, une croissance bactérienne était détectée dès 7 jours d'incubation dans le BCC pour les poudres traitées par OE. Le traitement par OE n'a pas été efficace pour stériliser les poudres constituant l'adhésif.

En considérant l'impact mécanique et l'efficacité microbiologique des deux méthodes de stérilisation évaluées, il convient de retenir l'irradiation  $\gamma$  pour la stérilisation des poudres constituant l'adhésif.

#### 4.4 Évaluation de la cytotoxicité de l'adhésif : test d'extraction

L'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité (Figure 24) était réalisée en contact indirect de l'adhésif (méthode d'extraction) sur des cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1. Après exposition aux extractions d'adhésifs TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA, la survie des cellules MC3T3-E1 était de  $110\% \pm 3\%$  et  $85\% \pm 5\%$ , respectivement. Ces résultats confirment l'absence de cytotoxicité de ces deux adhésifs selon les recommandations ( $>70\%$ ) de la norme ISO 10993-5. Ce résultat est en accord avec la littérature au sujet des adhésifs organo-minéraux dont la cytocompatibilité *in vitro* (188) et la biocompatibilité *in vivo* (16,20,40) sont reconnues.

En outre, la cytocompatibilité des nPDA (à des concentrations inférieures à 0,05 mg/mL) est aussi bien rapportée dans la littérature avec de multiples lignées cellulaires (204,213–215). Elles sont également biocompatibles *in vivo* (34,35,216). L'évaluation de la cytotoxicité a permis de confirmer la cytocompatibilité de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA avec un taux de survie cellulaire de 85%. Néanmoins, la faible diminution de vitalité comparé à l'adhésif TTCP/OPS ( $p=0,0009$ ) pourrait être attribuée au relargage de petites quantités de dopamine non polymérisée sous la forme de trimères auto-assemblés de dopamine<sub>2</sub>/5,6-dihydroxyindole (un produit intermédiaire lors de la synthèse de PDA) piégés au sein des nPDA, connus pour leur cytotoxicité (217,218).

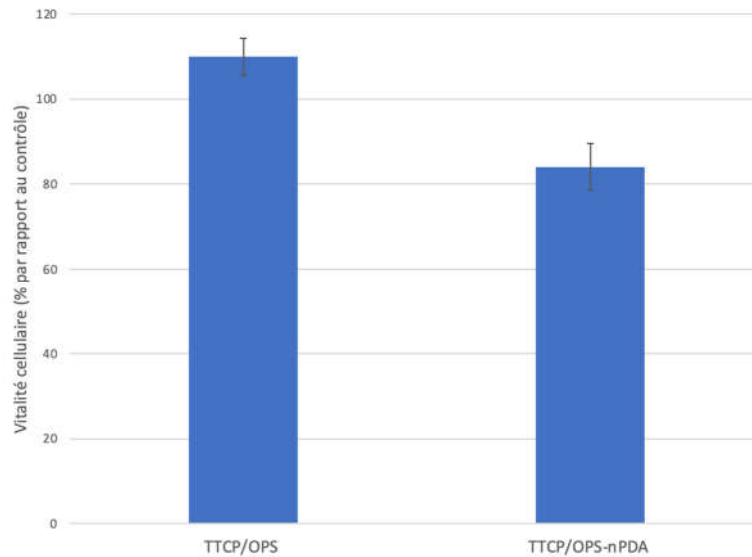


Figure 24 : Tests de cytotoxicité par méthode d'extraction réalisé sur des disques de TTCP/OPS et de TTCP/OPS-nPDA avec des cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1

#### 4.5 Évaluation *in vivo* de l'adhésif

L'adhésif TTCP/OPS-nPDA ayant démontré des propriétés adhésives supérieures au TTCP/OPS lors de tests mécaniques instrumentaux *in vitro* et *ex vivo*, ainsi qu'une absence de cytotoxicité, il convient d'évaluer son comportement lors d'une implantation *in vivo*. Trois modèles animaux, utilisant le rat, ont été développés à cet effet dans cette étude : un modèle d'ostéotomie tibiale, un modèle de fixation d'autogreffe osseuse ainsi qu'un modèle d'ostéotomie fibulaire. Ces modèles évalueront la biocompatibilité et les capacités adhésives dans un contexte de simulation de fracture avec contrainte mécanique forte (ostéotomie tibiale) ou faible (ostéotomie fibulaire) ou dans le cadre d'une simulation de reconstruction osseuse par autogreffe (fixation d'autogreffe).

##### 4.5.1 Modèle d'ostéotomie tibiale

Le modèle d'ostéotomie tibiale consistait en une section de la diaphyse tibiale suivie d'une fixation selon 4 modalités : plaque Ratfix® en PEEK transvissée, broche centromédullaire, adhésif TTCP/OPS combiné avec une broche centromédullaire ou adhésif TTCP/OPS-nPDA combiné avec une broche centromédullaire. Le succès clinique était défini comme une tenue mécanique de la zone fracturée lors du sacrifice ainsi que l'absence de déplacement secondaire.

#### 4.5.1.1 Évaluation macroscopique et radiographique

Parmi les 48 rats opérés, deux rats étaient décédés hors protocole (un dans le groupe TTCP/OPS 5 semaines et un dans le groupe TTCP/OPS-nPDA 5 semaines) et donc exclus de l'étude.

Dans le groupe avec fixation par plaque Ratfix® en PEEK transvissée, 3 sur 4 rats (75%) à 5 semaines et 2 sur 2 rats (100%) à 10 semaines présentaient une solidité clinique du foyer de fracture. Toutefois, 3 sur 6 rats (50%) présentaient un déplacement secondaire visible cliniquement et confirmé radiographiquement (Figure 25). Il existait donc un taux d'échec de 50% dans le groupe fixation par plaque Ratfix® en PEEK transvissée. L'ostéosynthèse par plaque transvissée en pratique clinique humaine est pourtant le *gold standard* du traitement de la majorité des fractures (219), notamment pour la fixation de fractures de la diaphyse tibiale (220). A la différence des humains, la charge mécanique présente au niveau des membres inférieurs du rat est bien plus élevée (2,4 *versus* 7 fois la masse corporelle respectivement). Elle est également supérieure à celles des autres quadrupèdes comme par exemple le chien (0,8 fois la masse corporelle) ou le mouton (1,1 fois la masse corporelle) (221). De plus, aucun moyen de contention n'est toléré par le rat pour éviter la mise en charge complète dès le réveil, tandis qu'une mise en charge graduelle est recommandée dans la plupart des fractures chez l'humain (222–224). Le rat présente donc une mise en charge immédiate de forte intensité. Le modèle d'ostéotomie du tibia avec ostéosynthèse par plaque en acier transvissée, décrit par *Savaridas et al.*, a pourtant démontré l'efficacité de cette solution de fixation (225). Les plaques Ratfix® sont spécifiquement commercialisées pour réaliser des ostéosyntheses du tibia chez le rat. Toutefois, le PEEK est un polymère bien plus souple que l'acier, entraînant la persistance d'une mobilité inter-fragments (226). Cette mobilité, aggravée dans un contexte de mise en charge intense et immédiate, est responsable de retard ou d'absence de consolidation. Il semble que l'utilisation de plaques métalliques soit préférable à celle de plaques en polymère comme le PEEK qui ne peut être retenu comme *gold standard*.

Dans le groupe avec fixation broche centromédullaire, la totalité des rats (3 sur 3 rats, 100%) à 5 semaines ainsi que celle des rats (2 sur 2 rats, 100%) à 10 semaines présentaient une solidité clinique du foyer de fracture, mais ils présentaient tous un déplacement secondaire visible cliniquement et confirmé radiographiquement (Figure 25). L'enclouage centromédullaire est une technique fréquemment utilisée pour fixer les fractures tibiales (220), mais l'embrochage réalisé ici ne constitue pas tout à fait un enclouage puisqu'il n'y a pas de transvissage proximal et distal associé. De plus, le diamètre de la broche n'est pas adapté à celui du canal médullaire du tibia du rat, surtout en proximal. La broche avait principalement pour but d'aider au maintien de la réduction lors de l'encollage. L'utilisation de la broche sans

encollage permet une consolidation mais n'évite pas le déplacement secondaire, ce qui constitue un échec.

Dans le groupe avec fixation par adhésif combiné avec une broche centromédullaire, aucun des rats (0 sur 7 rats, 0%) traités par encollage par TTCP/OPS ne présentait de solidité du foyer de fracture à 5 semaines. Seulement 2 sur 9 rats (22%) traités par encollage par TTCP/OPS-nPDA à 5 semaines présentaient une solidité clinique du foyer de fracture, toutefois avec un déplacement secondaire dans les deux cas. À 10 semaines, 8 sur 10 rats (80%) dans le groupe TTCP/OPS et 5 sur 9 rats (56%) dans le groupe TTCP/OPS-nPDA présentaient une solidité clinique du foyer de fracture, mais un déplacement secondaire était retrouvé dans tous les cas (Figure 25). Il n'y avait donc pas de bénéfice à l'encollage par rapport à la broche centromédullaire isolée qui permettait déjà à elle seule d'obtenir une solidité clinique mais n'évitait pas le déplacement secondaire. L'ajout d'un encollage semble même retarder l'obtention de la solidité clinique (10 semaines au lieu de 5 semaines) et n'évite pas le développement d'un déplacement secondaire.

Pour résumer, si certaines méthodes de fixation ont permis d'obtenir une solidité clinique (Tableau 2), aucune des méthodes de fixation utilisée n'a permis d'éviter l'apparition de déplacements secondaires. Il semble que les contraintes mécaniques appliquées sur le tibia du rat soient majeures et qu'une ostéosynthèse particulièrement rigide soit requise.

Tableau 2 : Récapitulatif du modèle d'ostéotomie tibiale – échantillons présentant une solidité clinique du foyer de fracture

	Plaque transvissée	Broche centromédullaire	TTCP/OPS	TTCP/OPS-nPDA
5 semaines	75% (3/4)	100% (3/3)	0% (0/7)	22% (2/9)
10 semaines	100% (2/2)	100% (2/2)	80% (8/10)	56% (5/9)



**Figure 25 :** Radiographies de profil du tibia après ostéotomie et fixation en postopératoire immédiat (colonne de gauche) et lors du sacrifice (colonne de droite). Un déplacement secondaire est présent sous la forme d'une angulation du tibia dans le plan sagittal au niveau du foyer de fracture dans chaque cas.

Les complications postopératoires rencontrées étaient la fenestration cutanée en regard de l'adhésif et l'infection locale abcédée. Ces complications ont toutes été associées à des échecs cliniques (Tableau 2). La fenestration a concerné 3 rats : 2 du groupe TTCP/OPS (sacrifiés à 5 semaines pour l'un et à 10 semaines pour l'autre) et 1 du groupe TTCP/OPS-nPDA (sacrifié à 5 semaines). L'infection locale abcédée a concerné 4 rats : 1 du groupe TTCP/OPS (sacrifié à 5 semaines) et 3 du groupe TTCP/OPS-nPDA (sacrifiés à 5 semaines pour 2 et à 10 semaines pour le dernier). Il y a également eu un cas de fracture comminutive du fragment proximal du tibia proximal en peropératoire dans le groupe TTCP/OPS (sacrifice à 5 semaines).

#### 4.5.1.2 Évaluation microtomodensitométrique

Trente-neuf échantillons (tibias explantés) sur 46 ont été analysés par  $\mu$ TDM car 7 échantillons en échec clinique patent n'ont pas été analysés.

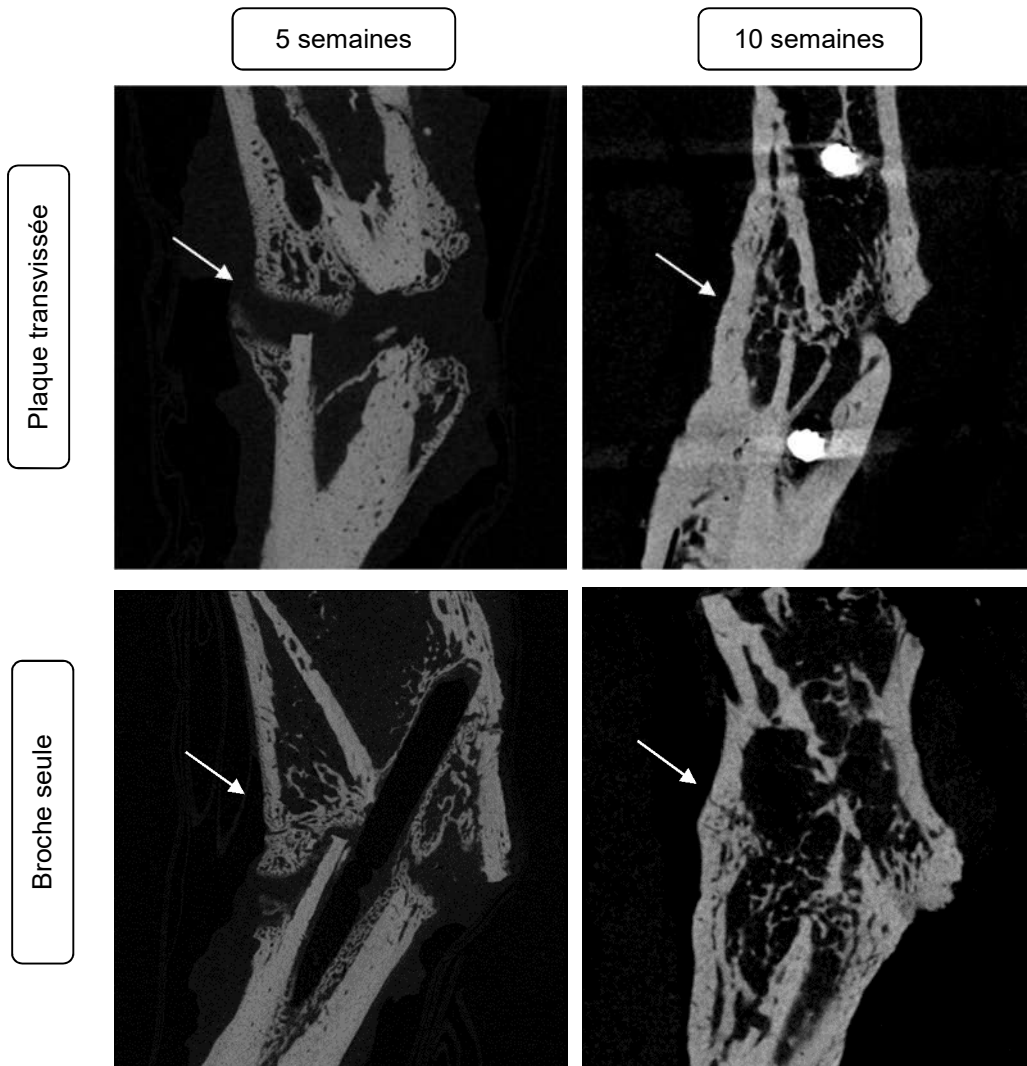
Dans les groupes avec fixation par plaque transvissée ou par broche centromédullaire, il était visualisé un cal circonférentiel largement prédominant en postérieur (Figure 26). Les berges du cal étaient proches l'une de l'autre à 5 semaines (en raison du retard radio-clinique) et jointives à 10 semaines, à l'exception du cas de plaque transvissée sans solidité clinique qui ne présentait pas de continuité osseuse.

Dans les groupes avec encollage par TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA présentant une solidité clinique, la continuité osseuse était souvent uniquement postérieure avec un volumineux cal osseux postérieur et une déhiscence antérieure (Figure 26). L'évolution entre 5 et 10 semaines était similaire avec un cal jointif et plus minéralisé à 10 semaines. L'adhésif (TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA) présentait des fractures en son sein mais était bien jointif à l'os tibial.

Cette disposition postérieure du cal retrouvée est liée au déplacement secondaire consistant en une angulation dans le plan sagittal. En effet, le tibia du rat présente déjà des courbures anatomiques normales dans le plan sagittal, le déplacement secondaire correspond à une accentuation de cette courbure. Cette accentuation est en lien avec la répartition des charges mécaniques, elle peut être aggravée par la consolidation en position non anatomique de la fibula fracturée en parallèle.

Quel que soit le groupe, la consolidation confirmée par l'analyse  $\mu$ TDM correspondait toujours à celle déjà notée comme une solidité clinique. Cette consolidation était uniquement postérieure dans les cas avec encollage (TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA) et circonférentielle avec prépondérance postérieure dans les cas de fixation par plaque transvissée ou par broche centromédullaire, en lien avec l'angulation sagittale constituant le déplacement secondaire.

Dans tous les cas ne présentant pas de solidité clinique (encollage TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA et le cas de plaque transvissée sans solidité), il était retrouvé une absence de continuité osseuse à la  $\mu$ TDM. Il existait des cals osseux postérieurs toutefois, ils n'étaient pas jointifs (un large espace persistait entre les deux cals) en raison d'une faible réaction périostée. Une comminution de l'adhésif et de l'os étaient souvent visualisés (Figure 26).



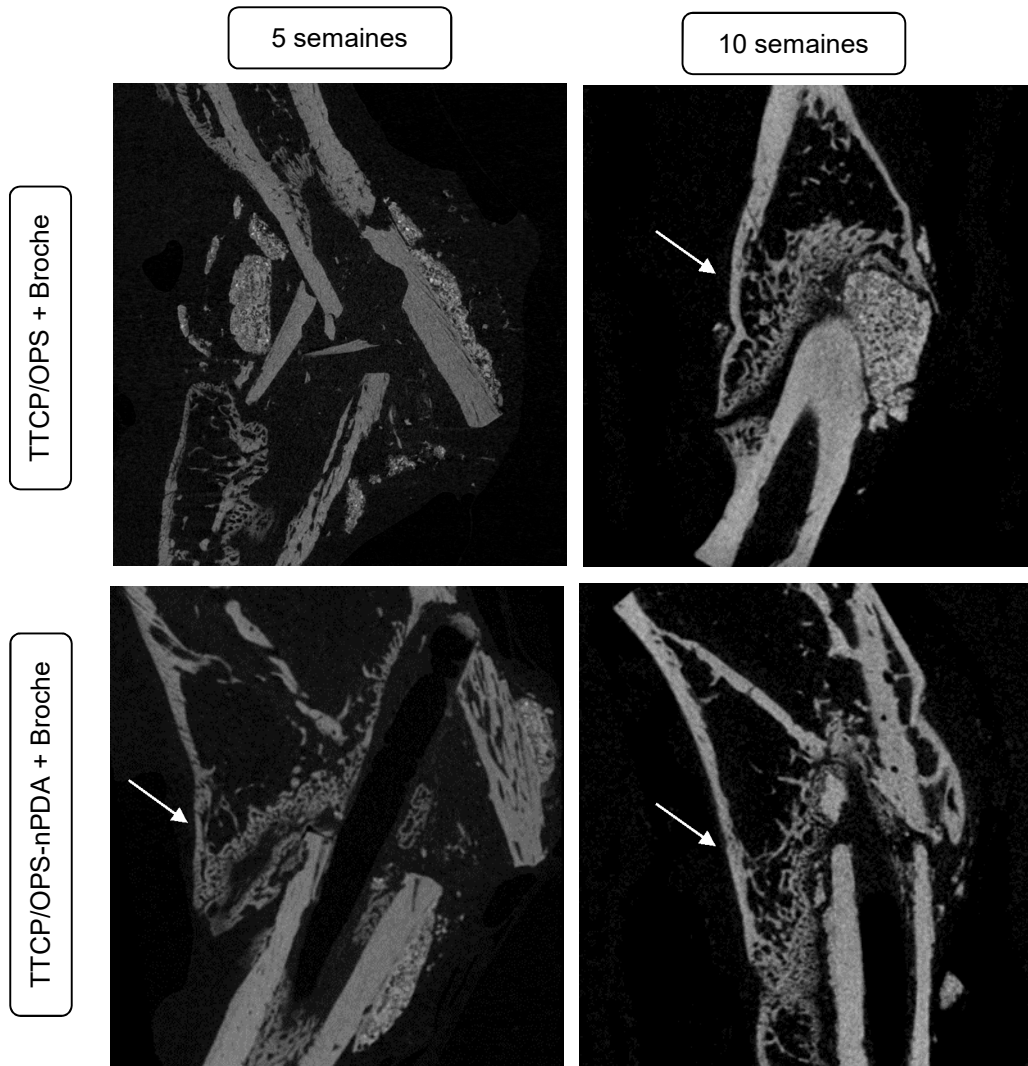
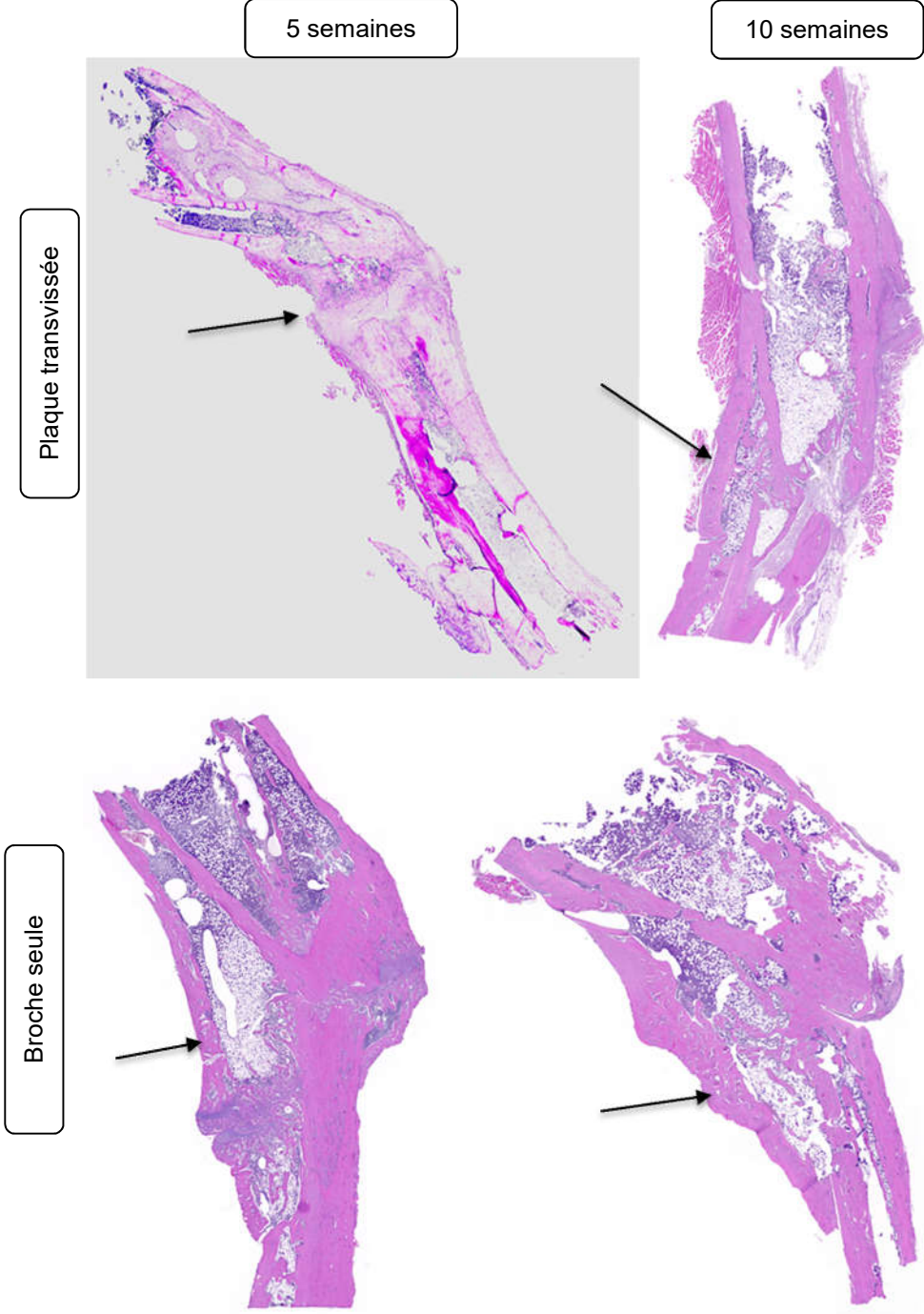


Figure 26 : Images microtomodensitométriques représentatives en coupes sagittales, orientées avec la face antérieure à droite, à 5 semaines (colonne de gauche) ou 10 semaines (colonne de droite) après fixation d'une ostéotomie du tibia de rat. À 5 semaines, il est visualisé le développement d'un cal osseux postérieur (flèche blanche ) dans tous les cas. À l'exception de l'encollage par TTCP/OPS, où il est retrouvé une comminution de l'os et de l'adhésif correspondant à une absence de solidité clinique. À 10 semaines, le cal osseux était plus développé avec une continuité osseuse

#### *4.5.1.3 Évaluation histologique*

Tous les échantillons analysés par  $\mu$ TDM étaient ensuite analysés histologiquement. Les résultats histologiques (Figure 27) concordent avec ceux de l'analyse  $\mu$ TDM. Dans les groupes avec fixation par plaque transvissée ou par broche centromédullaire isolée, une ossification enchondrale avec contact osseux était visualisée dès 5 semaines (à l'exception du cas traité par plaque transvissée ne présentant pas de solidité clinique). Cette zone de contact osseuse était plus importante et l'ossification était plus mature à 10 semaines. Dans les groupes avec encollage (TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA) avec solidité clinique, une zone d'ossification enchondrale correspondait au cal postérieur visible à la  $\mu$ TDM dès 5 semaines avec une ossification plus mature à 10 semaines.



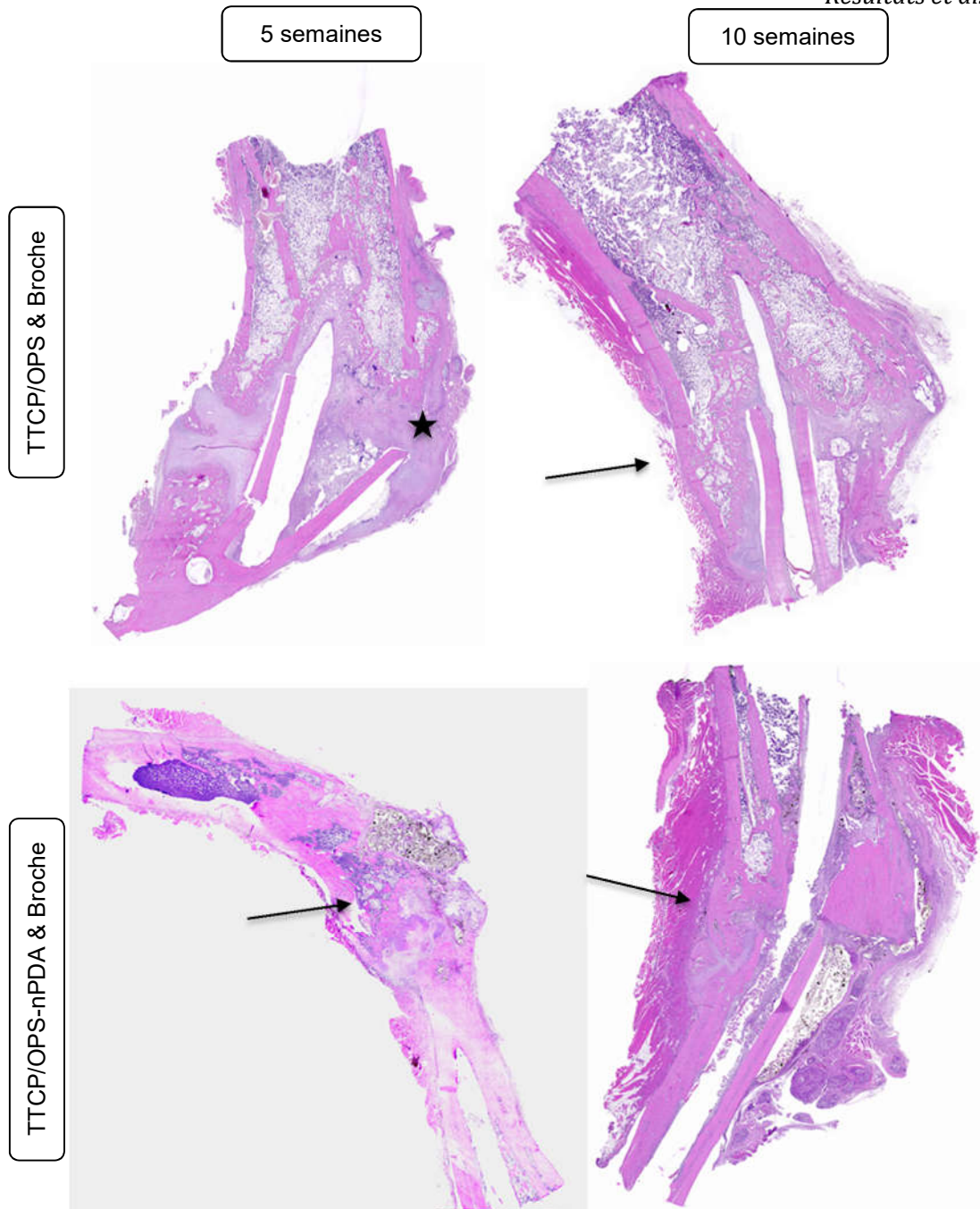
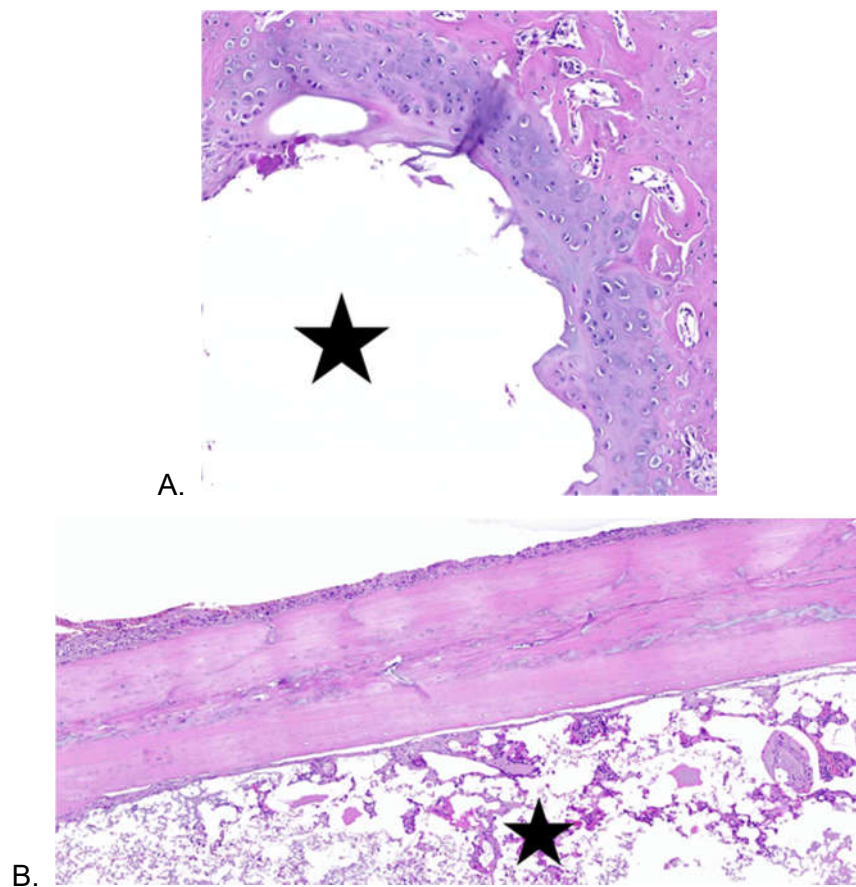


Figure 27 : Coupes histologiques sagittales (orientée avec la face postérieure à gauche) colorée à l'hématoxyline et éosine observée en microscopie optique ( $\times 10$ ) à 5 semaines (colonne de gauche) ou 10 semaines (colonne de droite) après fixation d'une ostéotomie du tibia de rat. Dès 5 semaines, un important cal osseux postérieur (flèche noire) est retrouvée avec une ossification enchondrale, à l'exception de TTCP/OPS qui est le siège d'une réaction inflammatoire (\*). À 10 semaines, il existe une continuité osseuse avec remodelage du tibia (flèche noire).

En dehors des résultats généraux mentionnés ci-dessus, certains détails vis-à-vis des méthodes de fixation ont été remarqués. Dans le groupe avec fixation par plaque transvisée, le contact entre les vis en titane et l'os n'entraînait pas d'inflammation mais une ostéogénèse

en direction de ces implants constituant un processus d'ostéointégration (Figure 28A), qui est bien connu depuis sa description par Per-Ingvar Brånemark (227,228). Dans les groupes avec encollage, l'adhésif se dégradait en raison du processus de décalcification. En effet, la partie minéralisée de l'adhésif était sensible de façon similaire au tissu osseux au processus de décalcification. Toutefois, il pouvait être observé un contact rapproché entre l'os et l'adhésif TTCP/OPS, séparés uniquement par une fine couche de tissu fibreux (Figure 28B). En revanche, une ossification enchondrale était retrouvée au contact de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA (Figure 28C). L'ajout de nPDA, qui promeuvent la régénération tissulaire et notamment la formation de tissu osseux (31), assure donc une meilleure intégration de l'adhésif avec le tissu osseux.



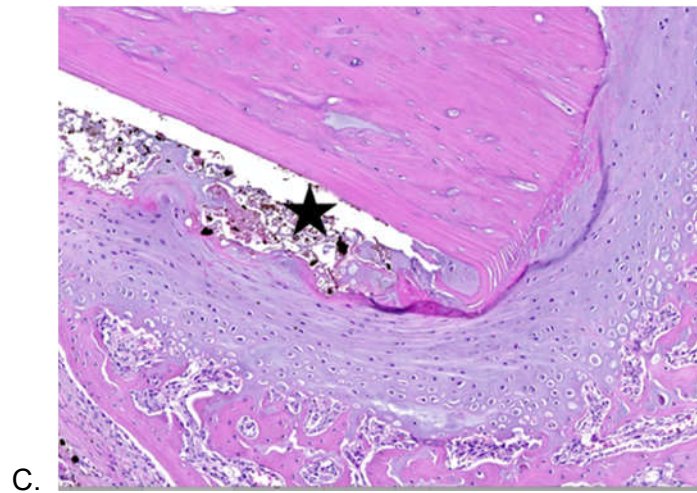


Figure 28 : Coupes histologiques sagittales colorée à l'hématoxyline et éosine observée en microscopie optique ( $\times 40$ ) à 10 semaines après fixation d'une ostéotomie du tibia de rat par plaque transvissée (A), par encollage TTCP/OPS et broche centromédullaire (B), par encollage TTCP/OPS-nPDA et broche centromédullaire (C). Il est visualisé une ossification enchondrale au contact de la vis en titane (A, l'orifice de la vis est marqué d'une ★), ainsi qu'un contact direct entre l'adhésif TTCP/OPS (B) ou TTCP/OPS-nPDA (C) et l'os, l'adhésif étant marqué d'une ★.

Dans les cas où la solidité clinique n'était pas obtenue, il était retrouvé de larges plages de tissu fibreux entre les fragments osseux ainsi qu'une importante réaction tissulaire envers l'adhésif signalant une résorption inflammatoire (Figure 29).



Figure 29 : Coupe histologique sagittale colorée à l'hématoxyline et éosine observée en microscopie optique ( $\times 10$ ) à 10 semaines après fixation d'une ostéotomie du tibia de rat par broche centromédullaire et encollage par TTCP/OPS. Les fragments osseux ne sont pas en contact mais sont

séparés par une large plage de tissu fibreux. L'adhésif (marqué par une ★) est également engagé dans une couche épaisse de tissu fibreux.

#### *4.5.1.4 Conclusion – modèle d'ostéotomie tibiale*

Le modèle d'ostéotomie tibiale n'a pas démontré de supériorité par encollage comparativement à la broche centromédullaire isolée pour la fixation d'une fracture en zone de contrainte mécanique majeure. Les fortes contraintes mécaniques ont par ailleurs participé à l'échec de la moitié des fixations du groupe contrôle par ostéosynthèse par plaque transvissée. Elles ont vraisemblablement induit des fractures au sein de l'adhésif qui n'a pas pu remplir son rôle sur le long cours. Les résultats des deux adhésifs n'ont pas été plus fructueux l'un que l'autre, toutefois, il a pu être noté que l'ajout des nPDA dans l'adhésif semble en faveur de l'intégration dans le tissu osseux.

#### **4.5.2 Modèle de fixation d'autogreffe osseuse**

Le modèle de fixation d'autogreffe osseuse consistait en l'autogreffe d'un segment de fibula sur la diaphyse du tibia homolatéral fixée selon 3 modalités : absence de fixation (groupe contrôle), fixation par adhésif TTCP/OPS ou par adhésif TTCP/OPS-nPDA. Le succès clinique était défini comme une tenue mécanique du greffon lors du sacrifice ainsi que l'absence de déplacement secondaire.

##### *4.5.2.1 Évaluation macroscopique*

Tous les rats ont survécu jusqu'au sacrifice programmé. Un rat, du groupe TTCP/OPS-nPDA sacrifié à 12 semaines, a présenté une fracture du tibia d'origine inexpliquée à distance du site d'encollage et de la vis de marquage. Ce site opératoire a été exclu de l'analyse.

Les complications étaient d'ordre infectieuses ou mécaniques. Tous les cas de complications étaient associés à des échecs de l'autogreffe (Tableau 3). Un cas d'infection s'était déclaré dans le groupe TTCP/OPS (sacrifice à 5 semaines) et une fenestration cutanée dans le groupe TTCP/OPS-nPDA (sacrifice à 5 semaines). Deux rats du groupe TTCP/OPS-nPDA ont présenté une fracture du tibia au niveau de la vis de marquage. La position de la vis a été modifiée suite à cette constatation, aucune autre fracture tibiale sur la vis n'a ensuite été à déplorer.

Dans le groupe contrôle, dans lequel l'autogreffe de fibula n'était pas fixée au tibia mais simplement apposée, 3 sur 5 autogreffes (60%) présentaient une tenue mécanique du greffon à 5 semaines, mais avec un déplacement secondaire (vis-à-vis de la vis de marquage). Dans les deux autres cas, ainsi que dans celui sacrifié à 12 semaines, l'autogreffe de fibula n'était pas retrouvée au sein de la jambe. La totalité des autogreffes non fixées présentaient donc un échec. En effet, même si les greffes sont appliquées directement sur un os (le tibia) qui supporte la quasi-totalité des charges mécaniques, des petites contraintes mécaniques liées aux mouvements des tissus mous environnant s'appliquent sur le greffon. Dès lors qu'une contrainte, même minimale s'applique, la fixation devient nécessaire pour éviter le déplacement des greffons et obtenir leur ostéointégration (54,55). De fait, au lieu de reconstruire une perte de substance, le déplacement de la greffe à une autre localisation ne nécessitant pas de reconstruction la rend inutile. Les autogreffes non fixées étaient donc responsables d'échec de l'autogreffe, validant ainsi le modèle.

Dans le groupe TTCP/OPS, 9 sur 18 autogreffes (50%) présentaient une tenue mécanique clinique à 5 semaines ainsi que 5 sur 7 (71%) de même à 12 semaines. Dans le groupe TTCP/OPS-nPDA, 10 sur 17 autogreffes (59%) présentaient une tenue mécanique clinique à 5 semaines ainsi que 5 sur 7 (71%) de même à 12 semaines (photo représentative en Figure 30). Ces résultats sont récapitulés dans le Tableau 3. Aucun déplacement secondaire n'était noté pour les greffons présentant une tenue mécanique dans les deux groupes d'adhésifs. L'encollage a donc permis une fixation efficace du greffon en empêchant la mobilisation des greffons. Il n'était pas possible de montrer une différence entre l'encollage par TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA dont les résultats étaient similaires.

Tableau 3 : Récapitulatif du modèle de fixation d'autogreffe – échantillons présentant une solidité du greffon de fibula sur le tibia

	Absence de fixation	TTCP/OPS	TTCP/OPS-nPDA
5 semaines	60% (3/5)	50% (9/18)	59% (10/17)
12 semaines	0% (0/1)	71% (5/7)	71% (5/7)

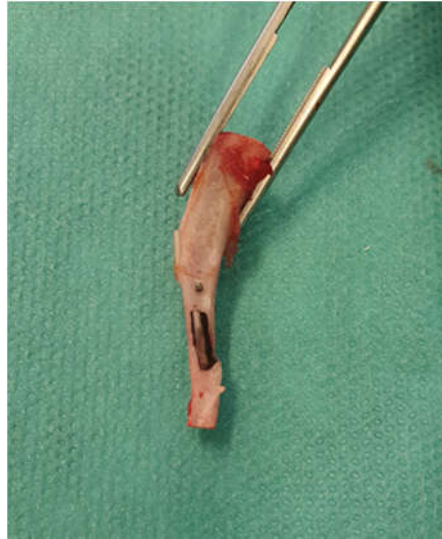
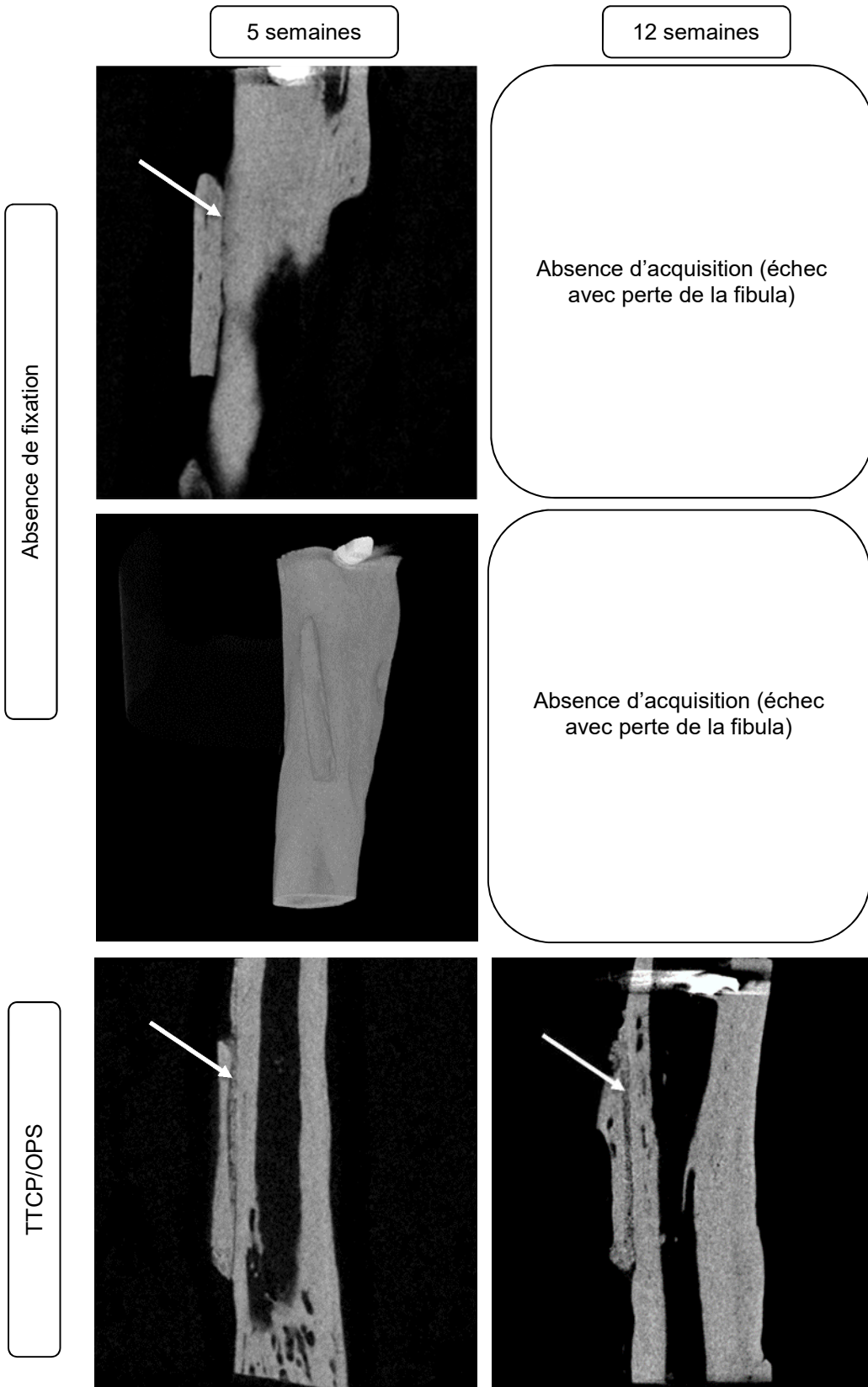


Figure 30 : Photographie après sacrifice d'une autogreffe de fibula encollée par TTCP/OPS-nPDA sur un tibia de rat. La greffe présente une tenue mécanique clinique et ne présente pas de déplacement secondaire vis-à-vis de la vis de marquage.

#### 4.5.2.2 Évaluation microtomodensitométrique

Quarante-deux échantillons ont été analysés par  $\mu$ TDM (Figure 31), car 14 cas parmi les échecs cliniques patents ont été exclus de l'analyse. L'évaluation  $\mu$ TDM corroborait les constatations macroscopiques puisque tous les échantillons présentant une tenue mécanique clinique présentaient une continuité intime sans interposition entre le greffon, l'adhésif et le tibia. Dans le groupe contrôle, pour les trois cas avec tenue mécanique, il existait une continuité osseuse partielle (localisée sur une partie de l'interface greffon-tibia) confirmant l'intégration du greffon. Toutefois, en raison du déplacement secondaire, cette intégration n'était pas présente sur le site receveur prévu. Dans le cas des greffes fixées avec succès par TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA, il était retrouvé un contact intime et continu (sans interposition tissulaire), entre la greffe, l'adhésif et le tibia à 5 et 12 semaines sur tout ou au moins une partie de la zone d'interface (Figure 31). Cette continuité entre les os et l'adhésif était associée cliniquement à une tenue mécanique.



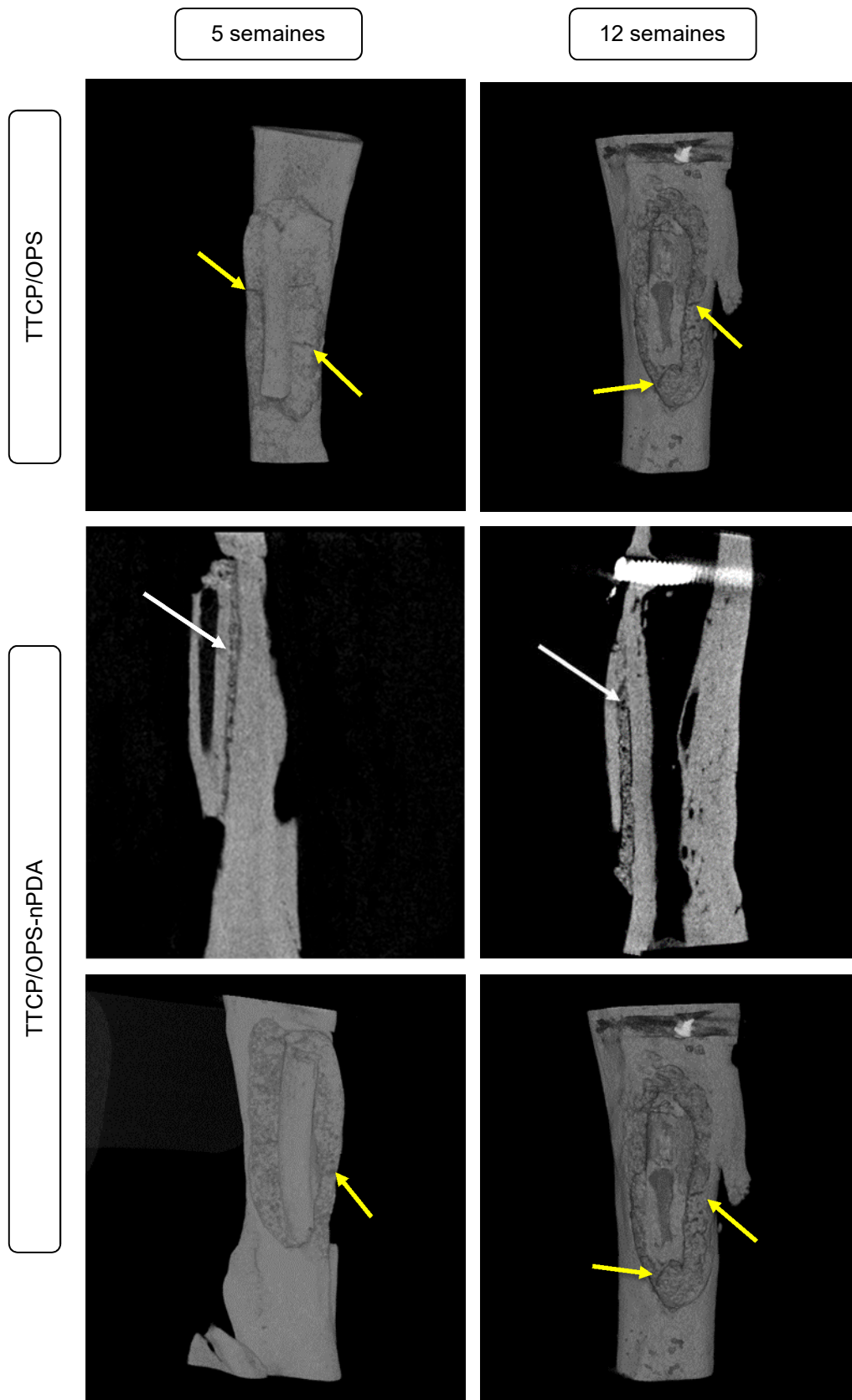


Figure 31 : Images microtomodensitométriques représentatives en coupes sagittales et en reconstruction tridimensionnelle à 5 semaines (colonne de gauche) ou 12 semaines (colonne de droite) après autogreffe de fibula sur tibia de rat présentant une solidité clinique. Il existe un contact intime

partiel supérieur entre l'autogreffe de fibula non fixée et le tibia à 5 semaines (flèche blanche). Il existe un contact intime entre la fibula, l'adhésif et le tibia dans les cas encollés par TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA à 5 comme à 12 semaines (flèches blanches). Des fissures au sein de l'adhésif sont visibles sur les reconstructions tridimensionnelles (flèches jaunes).

Lorsque la fixation était un échec, il était visualisé des solutions de continuité (image hypodense) entre la greffe et le tibia avec des fissures et une résorption de l'adhésif (Figure 32), qui se traduisait toujours cliniquement par une mobilité de la greffe.

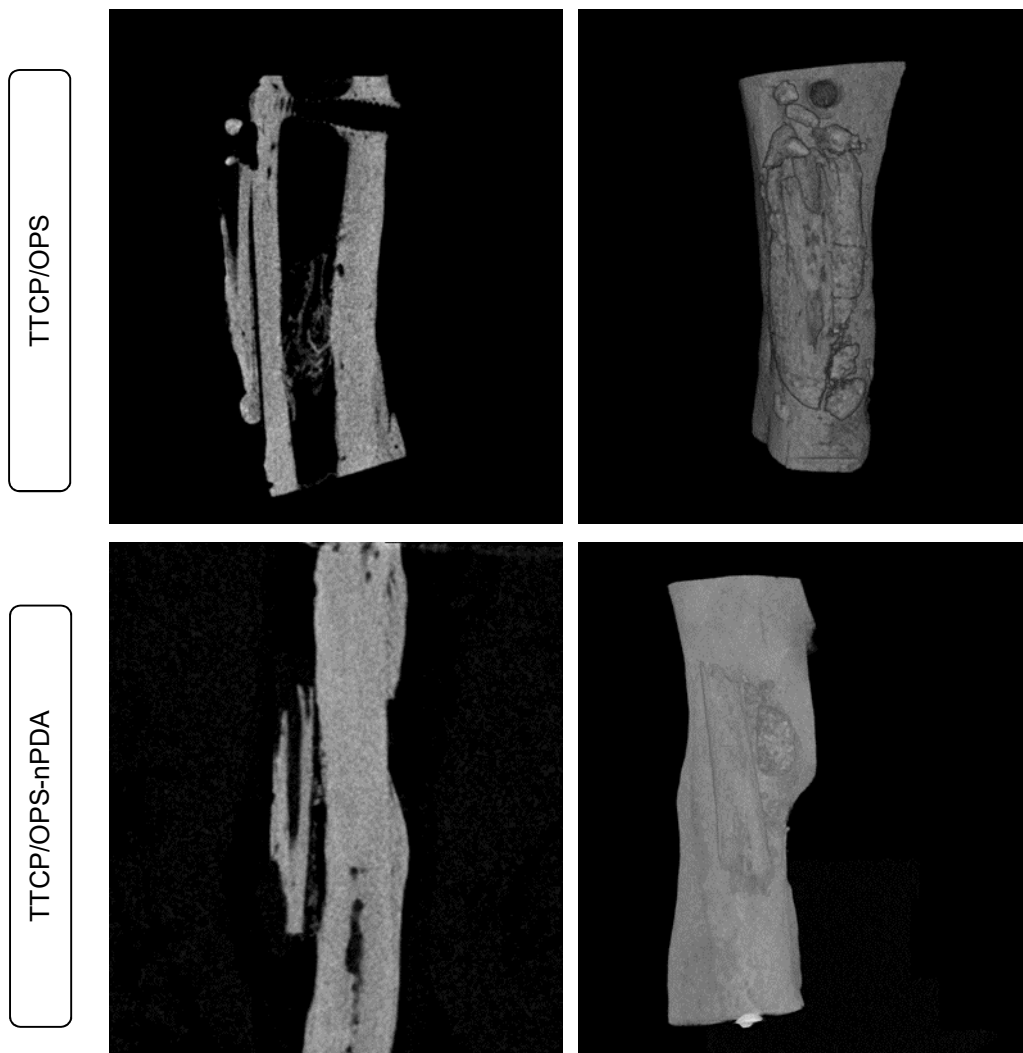


Figure 32 : Images microtomodensitométriques en coupes sagittales et en reconstruction tridimensionnelle à 5 semaines après autogreffe de fibula sur tibia de rat présentant un échec. Il est visualisé une large solution de continuité entre l'autogreffe de fibula et le tibia à la place de l'adhésif. L'adhésif est morcelé sur l'image TTCP/OPS et semble résorbé sur l'image TTCP/OPS-nPDA.

L'analyse semi-quantitative de la continuité était réalisée en 2 dimensions (coupes coronales et axiales, Figure 33) et en 3 dimensions (reconstruction volumique, Figure 34)

selon la grille d'évaluation (Tableau 1). Elle ne permettait pas de mettre en évidence de différences entre les adhésifs TTCP/OPS et TTCP/OPS-nPDA à 5 semaines en analyse 2D ( $2,43 \pm 1,72$  versus  $3 \pm 1,67$  respectivement,  $p=0,4$ ) ou 3D ( $2,71 \pm 1,89$  versus  $3,17 \pm 1,6$  respectivement,  $p=0,74$ ). Il en était de même à 12 semaines en analyse 2D ( $3 \pm 1,67$  versus  $2,86 \pm 1,97$  respectivement,  $p=0,89$ ) ou 3D ( $3,17 \pm 1,6$  versus  $3 \pm 2,06$  respectivement,  $p=0,65$ ). Il y avait une tendance à 5 semaines à un score supérieur pour l'adhésif TTCP/OPS-nPDA, mais à l'inverse une tendance à 12 semaines à un score légèrement supérieur pour l'adhésif TTCP/OPS. La meilleure continuité à 5 semaines dans le groupe TTCP/OPS-nPDA pourrait s'expliquer par les propriétés de minéralisation des nPDA démontrées dans la section 4.2.5.

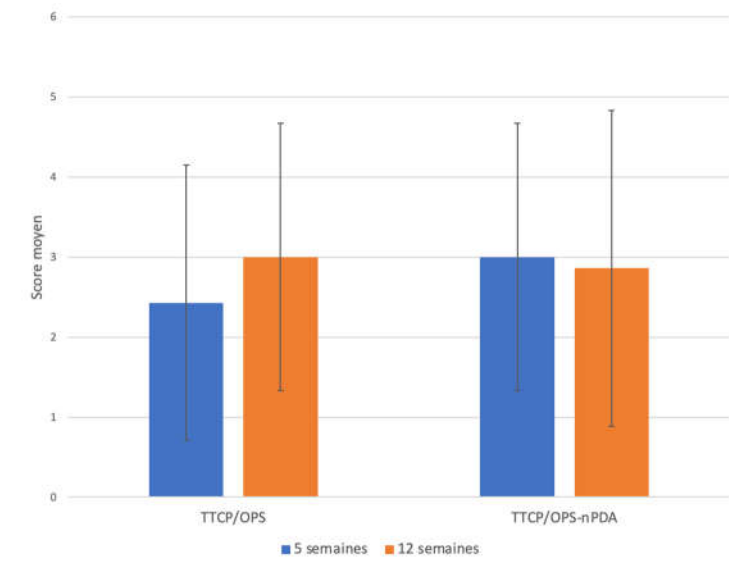


Figure 33 : Évaluation semi-quantitative de la continuité entre l'adhésif et le tibia sur des coupes bidimensionnelles selon la grille de score explicitée dans la section 3.7.3.3

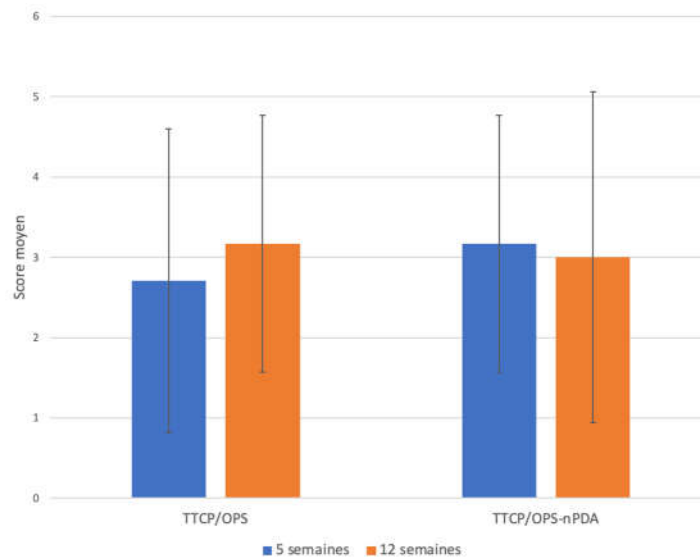


Figure 34 : Évaluation semi-quantitative de la continuité entre l'adhésif et le tibia sur des images tridimensionnelles selon la grille de score explicitée dans la section 3.7.3.3

#### 4.5.2.3 Évaluation histologique

L'évaluation histologique qualitative était réalisée sur des échantillons non décalcifiés pour éviter la dissolution de l'adhésif et donc un détachement de l'autogreffe, afin de mieux visualiser l'interface greffe-adhésif-tibia. Dans les groupes avec fixation de l'autogreffe par adhésif (TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA) avec tenue mécanique clinique, il était retrouvé une interposition de l'adhésif entre les surfaces osseuses sans inflammation au pourtour de l'adhésif à 5 comme à 12 semaines (Figure 35).

Au sein de l'adhésif TTCP/OPS, il était retrouvé un infiltrat cellulaire dès 5 semaines dont l'aspect correspond à des cellules inflammatoires (Figure 36). À 12 semaines, il était retrouvé dans certaines zones au sein de l'adhésif une formation de tissu osseux (Figure 36). Le profil précis des cellules visualisées au sein de l'adhésif est en cours d'analyse par un marquage immunohistochimique à la recherche d'ostéoblastes et de leurs précurseurs ainsi que des macrophages, responsables de la réaction à corps étranger.

L'évaluation de la structure interne de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA et son éventuelle colonisation cellulaire n'était malheureusement pas possible pour des raisons techniques. En effet, la découpe des échantillons était réalisée par laser, or les nPDA ressemblent à la mélanine et possèdent donc des propriétés de photoprotection en absorbant une large gamme de rayons électromagnétiques (204,213). La longueur d'onde de ce laser n'a ainsi pas permis une découpe optimale de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA empêchant de visualiser la structure interne et entraînant une découpe plus traumatique avec un détachement de l'adhésif du tibia dans la plupart des cas. Il existe d'autres techniques de coupes des tissus durs calcifiés,

par exemple, la section par des microtomes à lames spécifiques ou le polissage (*ground section*). Toutefois, ces deux méthodes sont traumatiques contrairement au laser et pourraient entraîner un détachement systématique de l'autogreffe. De plus, le polissage ne permet d'obtenir que des coupes épaisses avec une faible résolution, la faible qualité de l'image ne permettra pas une observation cellulaire en détail, a fortiori dans un matériau aussi sombre que le TTCP/OPS-nPDA. Une solution alternative qui pourrait être envisagée pour éviter le problème de la photoprotection serait la découpe par un jet d'eau à haute pression. En effet, cette technique permet la découpe de l'os et du ciment sans décalcification préalable (229), elle reste toutefois plus traumatique que la découpe laser. Malgré cet écueil technique, il a pu être observé à 12 semaines une couverture des berges de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA (Figure 37) par du tissu osseux néo-formé démontrant l'ostéoconduction de l'adhésif. Cela n'était qu'exceptionnellement retrouvé dans le groupe TTCP/OPS. Les nPDA sont ostéo-inductives et génèrent un microenvironnement adapté à l'adhésion et la prolifération cellulaire promouvant la régénération tissulaire et notamment la formation de tissu osseux (31). Ces propriétés se sont traduites cliniquement par ce recouvrement par du tissu osseux de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA.

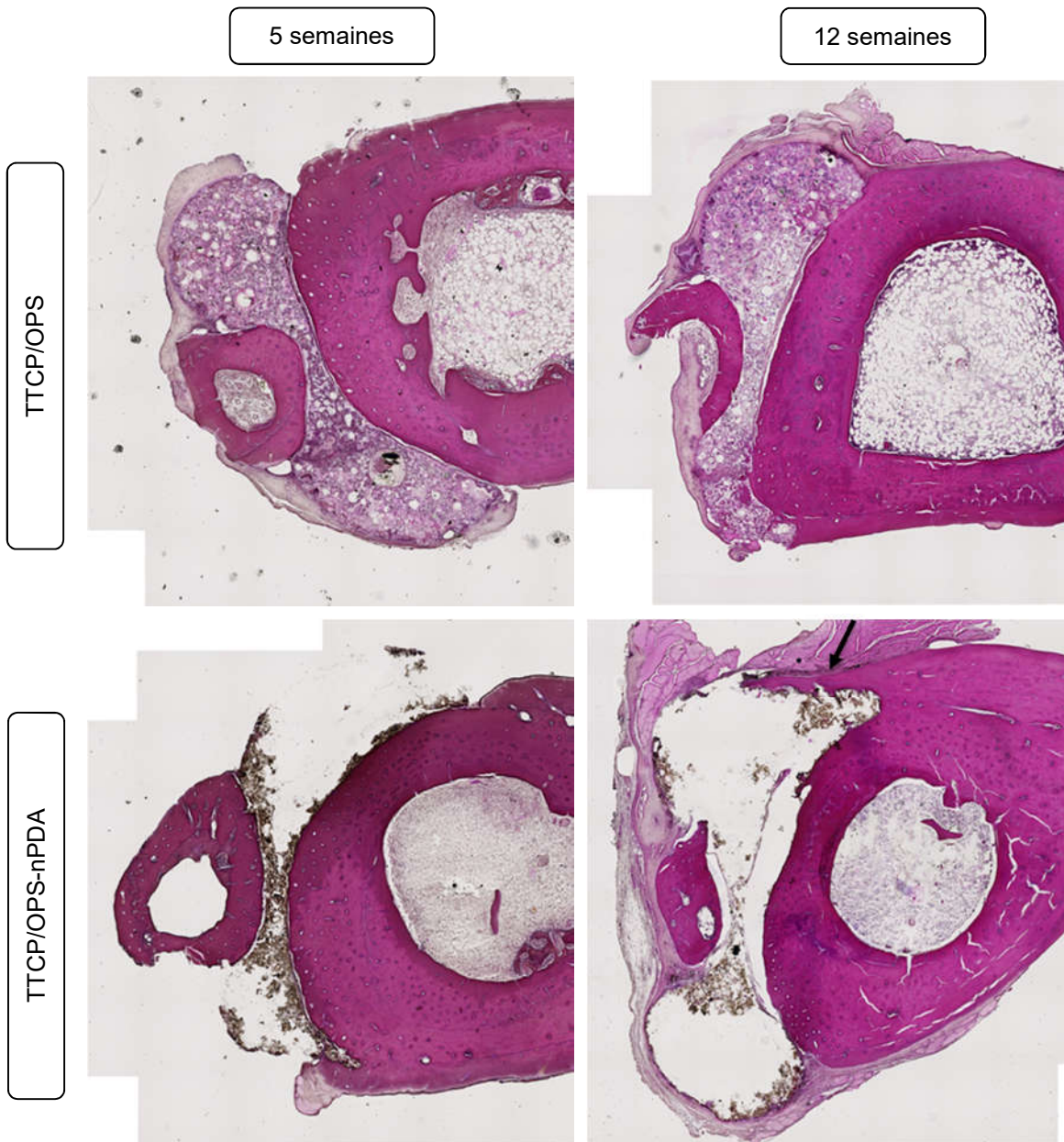


Figure 35 : Coupes histologiques non décalcifiées colorées à l'hématoxyline-éosine observées en microscopie optique ( $\times 10$ ) à 5 semaines (colonne de gauche) ou 12 semaines (colonne de droite) après autogreffe de fibula encollée sur tibia de rat présentant une solidité clinique. Ces images montrent l'absence de réaction inflammatoire ainsi que le développement d'une couverture de l'adhésif par de l'os néoformé à 12 semaines sur l'adhésif TTCP/OPS-nPDA (flèche noire).

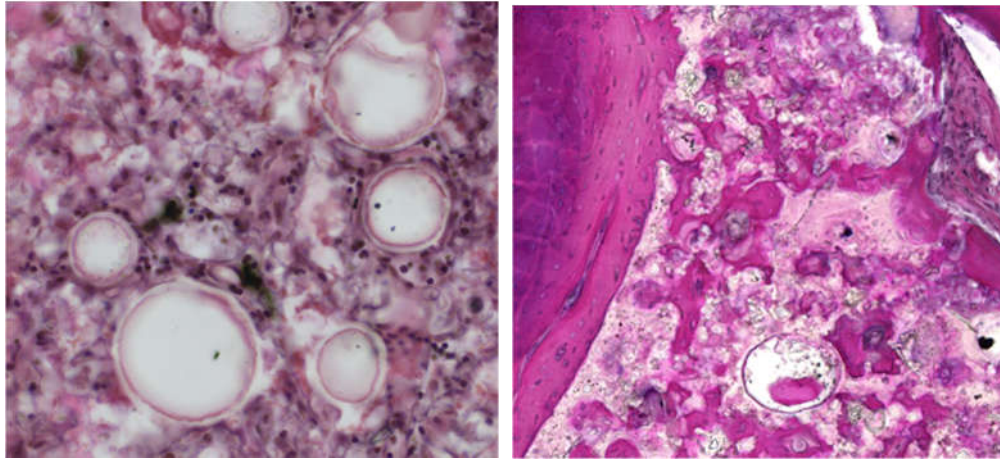


Figure 36 : Coupes histologiques non décalcifiées colorées à l'hématoxyline-éosine observées en microscopie optique ( $\times 40$ ) après autogreffe de fibula encollée par TTCP/OPS sur tibia de rat présentant une solidité clinique. Il est visualisé à 5 semaines (image de gauche) un infiltrat cellulaire et à 12 semaines (image de droite) une formation de tissu osseux à droite.

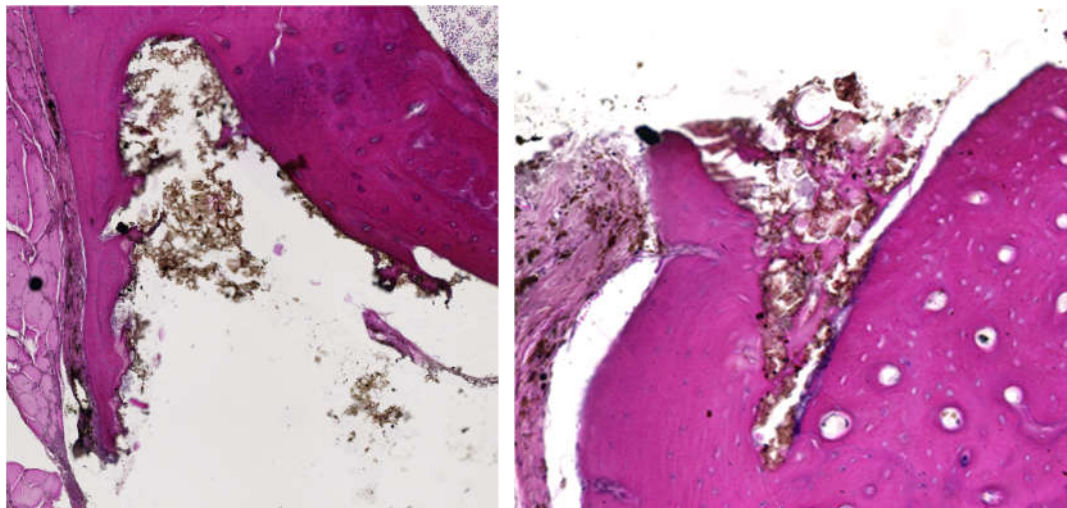
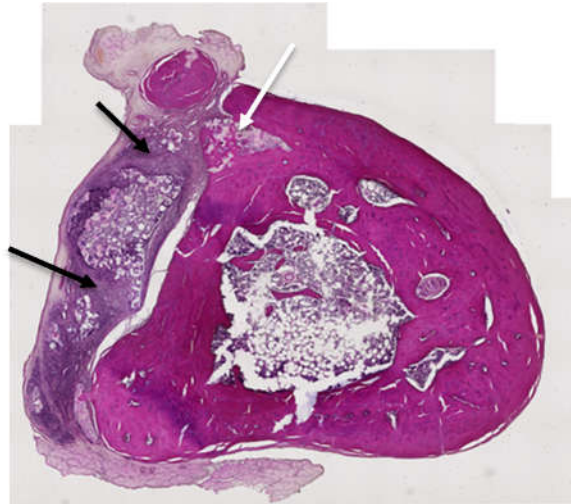


Figure 37 : Coupes histologiques non décalcifiées colorées à l'hématoxyline-éosine observées en microscopie optique ( $\times 40$ ) à 12 semaines après autogreffe de fibula encollée par TTCP/OPS-nPDA sur tibia de rat présentant une solidité clinique. Il est visualisé le contact intime entre l'os tibial et l'adhésif, ainsi que le recouvrement des berges de l'adhésif par le tissu osseux (à gauche). Une formation de tissu osseux est visible au sein de l'adhésif (à droite).

Dans les cas présentant une absence de tenue mécanique de l'autogreffe (échec clinique), il était toujours visualisé une encapsulation de l'adhésif par un tissu fibreux (Figure 38). Cette encapsulation ne concernait pas tout l'adhésif, certaines parties pouvaient tout à fait être en cours d'ostéointégration (Figure 38). Ces échecs peuvent avoir plusieurs causes mais la présence de fissures au sein de l'adhésif peut expliquer la réaction inflammatoire envers une partie de l'adhésif et l'intégration d'une autre partie. Ces fissures sont liées à la

fragilité des CPC, l'augmentation de la cohésion au sein de l'adhésif pourrait éviter la formation de ces fissures et éviter ces échecs. Plusieurs solutions peuvent être envisagées pour augmenter la résistance mécanique de l'adhésif comme discuté en 4.2.3 pour l'amélioration de la résistance en compression. L'ajout de lactate de chitosan, de fibres de PLGA ou de fils de suture en PLGA ont notamment déjà été étudiées (40). La voie la plus prometteuse, permettant d'augmenter la cohésion de l'adhésif tout en diminuant le moins possible l'adhésion elle-même était celle de l'ajout de fibres de PLGA (40).



**Figure 38 :** Coupe histologique non décalcifiée colorée à l'hématoxyline-éosine observée en microscopie optique ( $\times 10$ ) à 12 semaines après autogreffe de fibula encollée par TTCP/OPS sur tibia de rat présentant une absence de tenue mécanique. Il est visualisé une encapsulation de l'adhésif dans un tissu inflammatoire (flèches noires). Toutefois, du tissu osseux se forme dans la partie supérieure de l'adhésif (flèche blanche).

#### 4.5.2.4 Conclusion – modèle d'autogreffe osseuse

L'absence de fixation de l'autogreffe entraîne un échec par perte du greffon ou par déplacement secondaire, confirmant la présence de contraintes mécaniques faibles (contractions musculaires). L'adhésif osseux est biocompatible et permet la fixation d'une autogreffe osseuse en milieu avec contrainte mécanique faible. Les analyses cliniques réalisées n'ont pas permis de déterminer de différence significative entre l'adhésif sans et avec nPDA. Toutefois, il a été observé des recouvrements par du tissu osseux de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA démontrant des propriétés d'ostéoconduction et de promotion de la régénération osseuse supérieure liée aux nPDA. De plus, les nPDA peuvent être fonctionnalisées avec divers agents qui pourraient ajouter d'autres propriétés à l'adhésif, notamment des antibiotiques comme la ciprofloxacine (section 4.6).

Par ailleurs, ce modèle confirme l'intérêt de l'histologie non décalcifiée pour l'analyse d'adhésif comprenant une part minérale. Toutefois, la solution idéale de découpe est encore à déterminer lorsque l'adhésif contient une molécule photo-absorbante comme les nPDA.

### **4.5.3 Modèle d'ostéotomie fibulaire**

Le modèle d'ostéotomie fibulaire consistait en une section de la fibula au niveau de sa jonction avec le tibia suivie de la fixation de la fibula selon 3 modalités : absence de fixation (groupe contrôle), fixation par adhésif TTCP/OPS ou par adhésif TTCP/OPS-nPDA. Le succès clinique était défini comme une tenue mécanique de la zone fracturée lors du sacrifice ainsi que l'absence de déplacement secondaire.

#### *4.5.3.1 Évaluation macroscopique*

Tous les rats ont survécu à l'exception d'un seul (fixation par encollage TTCP/OPS d'un côté et TTCP/OPS-nPDA de l'autre), sacrifié en raison d'une perte de poids majeure après 9 semaines (le sacrifice était prévu à 12 semaines), qui a été exclu de l'étude. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 4.

Dans le groupe contrôle (sans adhésif), 1 cas sur 2 (50%) présentaient une solidité clinique à 5 semaines comme à 12 semaines. Il existait un important déplacement secondaire de la fibula avec solidité clinique à 5 semaines. La nécessité d'une fixation pour obtenir une consolidation mais surtout une réduction optimale était démontrée pour ce modèle.

Dans le groupe TTCP/OPS, seulement 1 cas sur 5 (20%) présentaient une solidité clinique à 5 semaines et 1 cas sur 4 (25%) à 12 semaines. Dans le groupe TTCP/OPS-nPDA, aucun cas sur 5 (0%) ne présentait de solidité clinique à 5 semaines, tandis que 1 cas sur 4 (25%) présentait une solidité clinique à 12 semaines. L'encollage ne permettait donc pas d'obtenir une solidité clinique du foyer de fracture dans la grande majorité des cas.

Chez le rat, la fibula est grêle et fusionnée en distalité avec le tibia tandis que le tibia supporte la quasi-totalité des charges mécaniques de la jambe (230). Le modèle d'ostéotomie fibulaire ne comprenait donc que des charges mécaniques très faibles. Toutefois, la fracture était réalisée au niveau de la jonction entre le tibia et la fibula, or la fibula étant très grêle, la surface de contact avec le tibia est minimale, ce qui constitue une difficulté puisque l'adhésion nécessite une surface de contact concrète. De plus, la fibula a une position centrale au niveau de la jambe du rat au contact des puissants muscles long fléchisseur de l'hallux, fibulaire, gastrocnémien et plantaire (231). Le muscle long fléchisseur de l'hallux est notamment un muscle large, interposé entre le tibia et la fibula. La contraction de ces différents muscles est

responsable de contraintes mécaniques d'orientations diverses, qui ajoutées aux surfaces encollées de congruence faible entre la fibula et le tibia, sont probablement les responsables de l'échec de l'encollage. En effet, même si les contraintes transmises par le poids du corps sont minimales par rapport au modèle d'ostéotomie tibiale décrit ci-dessus, l'action itérative de forces avec des vecteurs différents a accéléré la fatigue au sein de l'adhésif. En effet, un test préliminaire avec sacrifice après 2 jours avait montré une réduction satisfaisante avec un adhésif en place. Le renforcement de la résistance mécanique de l'adhésif lui-même paraît à nouveau nécessaire.

Tableau 4 : Récapitulatif du modèle d'ostéotomie fibulaire – échantillons présentant une solidité du foyer de fracture

	Non fixée	TTCP/OPS	TTCP/OPS-nPDA
5 semaines	50% (1/2)	20% (1/5)	0% (0/5)
12 semaines	50% (1/2)	25% (1/4)	25% (1/4)

#### 4.5.3.2 Évaluation microtomodensitométrique

Les acquisitions  $\mu$ TDM des cas présentant une solidité (Figure 39) montrait la présence d'un cal osseux entre la fibula et le tibia. Ce cal n'était pas complètement visible sur les reconstructions tridimensionnelles, surtout dans le groupe contrôle, en raison d'une minéralisation osseuse au sein du cal encore faible (retard radioclinique). En effet, en l'absence de contraintes mécaniques importantes, la phase de remodelage de la consolidation osseuse est lente. Dans les cas avec encollage TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA, de l'adhésif est visible autour de la jonction, toutefois celui-ci présente des fissures internes à l'adhésif.

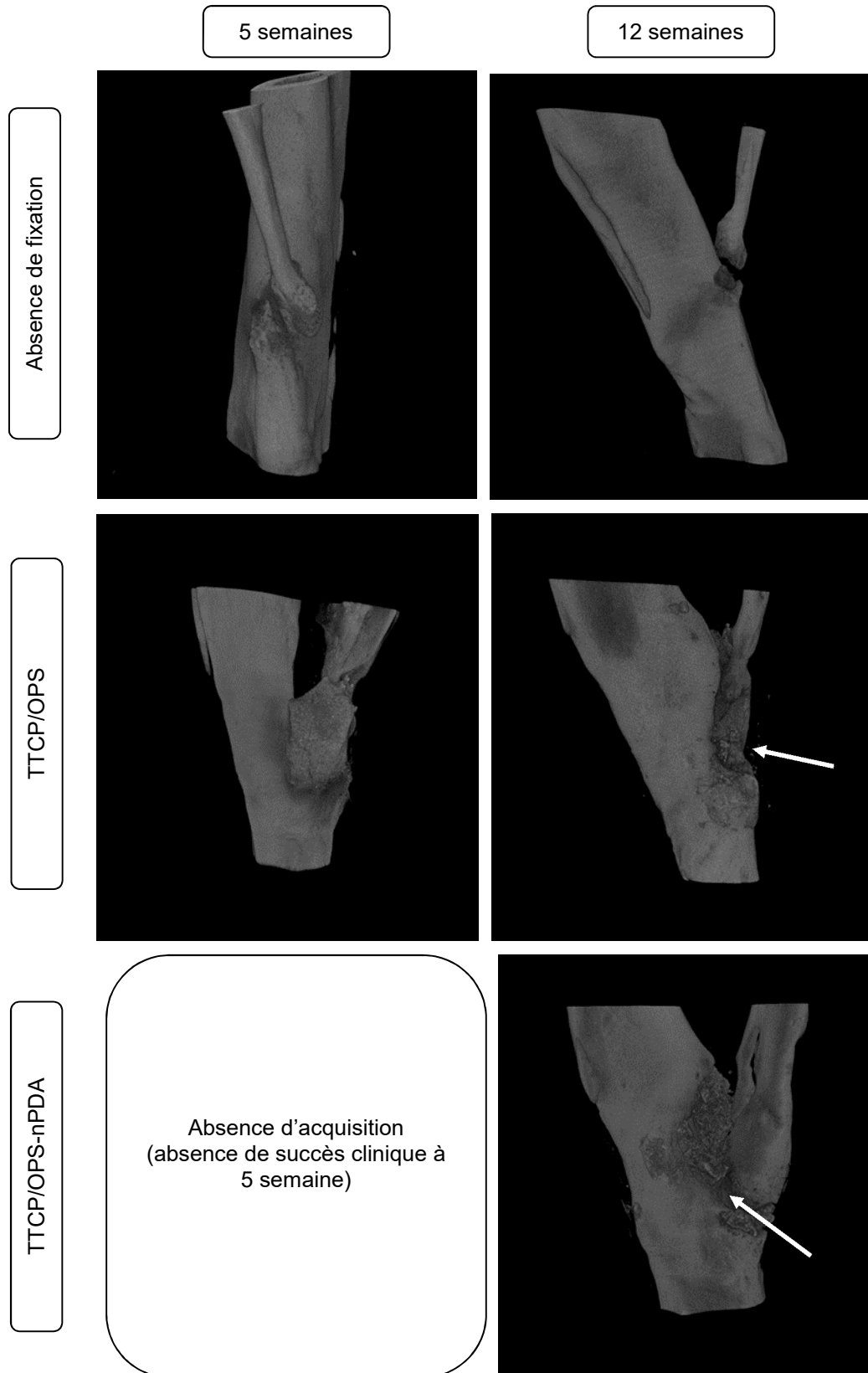


Figure 39: Images microtomodensitométriques représentatives en reconstruction tridimensionnelle à 5 semaines (colonne de gauche) ou 12 semaines (colonne de droite) après fracture à la fonction tibio-fibulaire présentant une solidité clinique. Dans le cas sans fixation, il existe un processus de cicatrisation entre les deux fragments, le cal n'est totalement pas visible radiologiquement.

Dans les cas avec encollage, il est visualisé un adhésif en interposition entre la fibula et la tibia à 5 semaines et une continuité osseuse avec un cal osseux entre les deux fragments avec un adhésif en partie résorbé à 12 semaines (flèches blanches).

Dans les cas avec encollage (TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA) sans solidité clinique, il n'est pas retrouvé de cal osseux entre les fragments (Figure 40). Lorsqu'un encollage a été réalisé, l'adhésif est morcelé par de nombreuses fractures. Cela confirme l'échec de l'encollage par la fragilité de l'adhésif et la nécessité d'un renforcement de sa résistance mécanique.

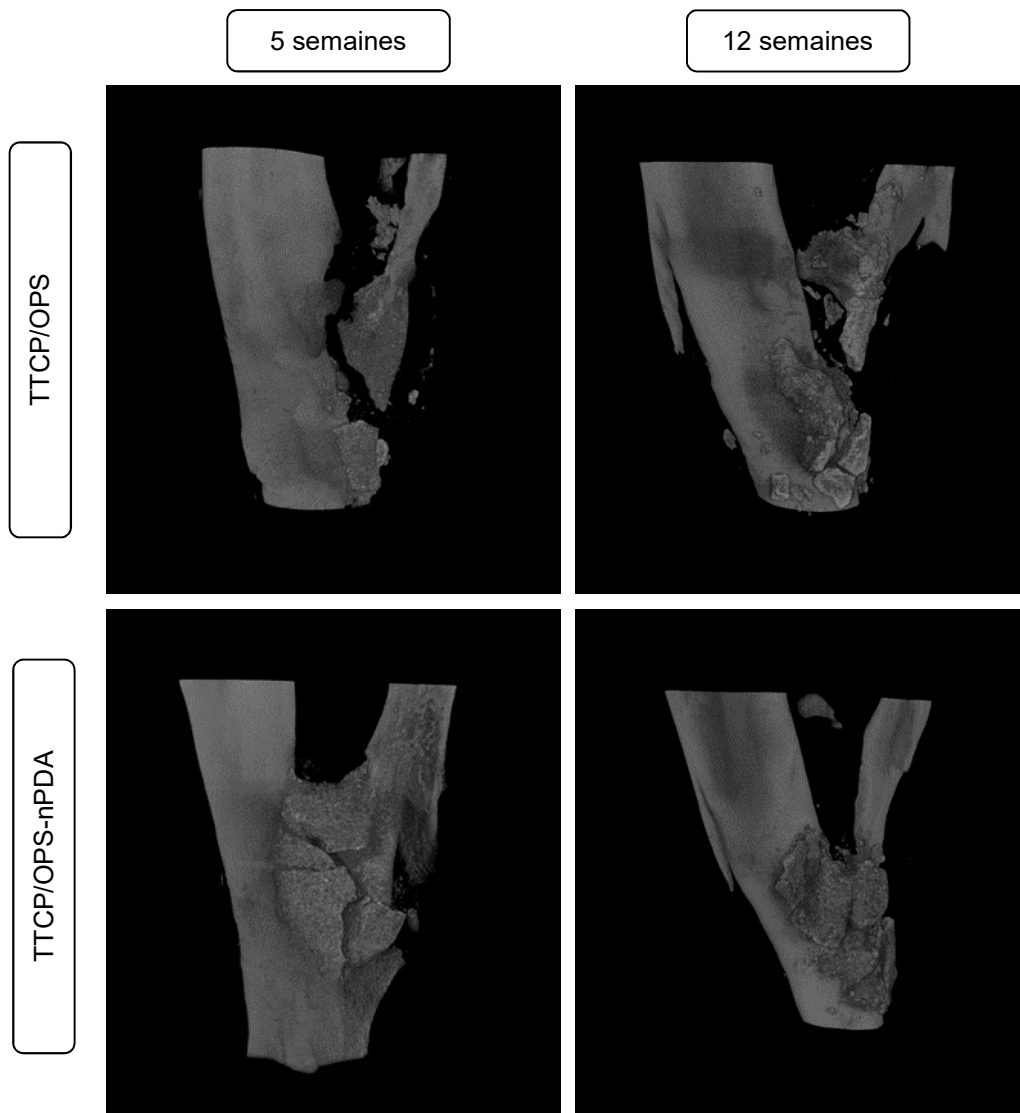


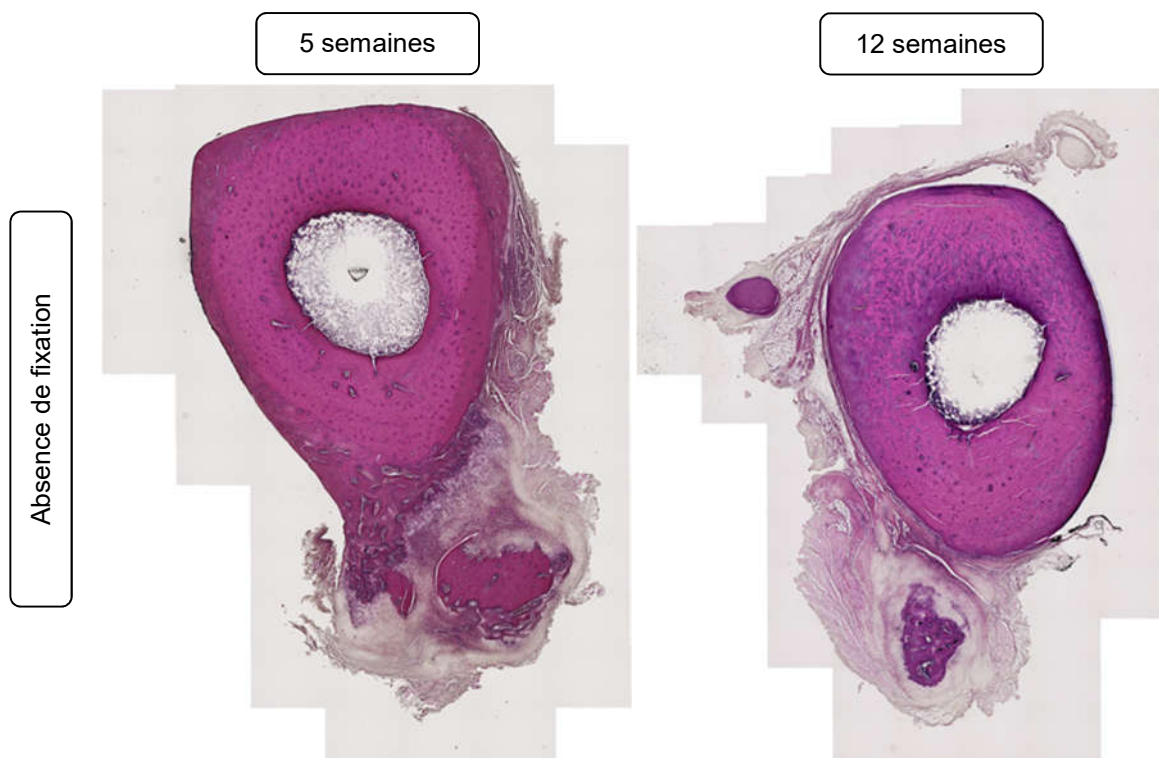
Figure 40: Images microtomodensitométriques représentatives en reconstruction tridimensionnelle à 5 semaines (colonne de gauche) ou 12 semaines (colonne de droite) après fracture à la fonction tibio-fibulaire présentant un échec clinique. Il n'existe pas de jonction osseuse tibio-fibulaire, l'adhésif est fracturé de façon comminutive.

#### 4.5.3.3 Évaluation histologique

L'évaluation histologique qualitative était réalisée sur des échantillons non décalcifiés selon un processus identique (technologie laser) et pour les mêmes raisons (éviter la décalcification de l'adhésif) que dans le modèle d'autogreffe, afin de mieux analyser la jonction fibulo-tibiale.

Dans le groupe contrôle, pour les échantillons présentant une solidité clinique, il était retrouvé un important cal avec ossification enchondrale, plus mature à 12 semaines qu'à 5 semaines (Figure 41). Cela confirmait la consolidation osseuse en cours, lente en raison de la faible charge mécanique supportée par la fibula.

Dans les groupes avec encollage TTCP/OPS ou TTCP/OPS-nPDA, pour les échantillons présentant une solidité clinique, la fibula était retrouvée au sein de l'adhésif. Il existait une continuité directe tibia-adhésif-fibula. À 12 semaines, les berges de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA présentaient une couverture par du tissu osseux néo-formé démontrant à nouveau l'ostéoconduction de l'adhésif contenant les nPDA (Figure 42).





**Figure 41 :** Coupes histologiques non décalcifiées colorées à l'hématoxyline-éosine observées en microscopie optique ( $\times 10$ ) tridimensionnelle à 5 semaines (colonne de gauche) ou 12 semaines (colonne de droite) après fracture à la fonction tibio-fibulaire présentant une solidité clinique. Dans le groupe sans fixation, il est visualisé une plage d'ossification enchondrale entre la fibula et le tibia dès 5 semaines. Dans les groupes avec encollage, il est visualisé une continuité entre le tibia, l'adhésif et la fibula. Une fissure de l'adhésif (flèches blanches) est visible sur l'échantillon TTCP/OPS à 5 semaines et l'échantillon TTCP/OPS-nPDA à 12 semaines. Une réaction à corps étranger (flèche noire) est visible du côté gauche de l'adhésif TTCP/OPS à 12 semaines.

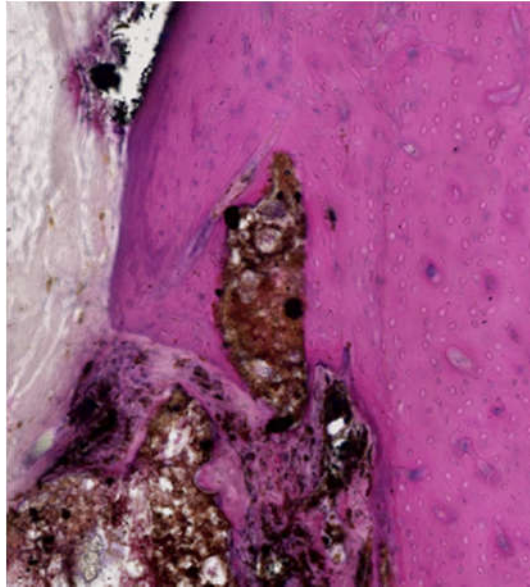
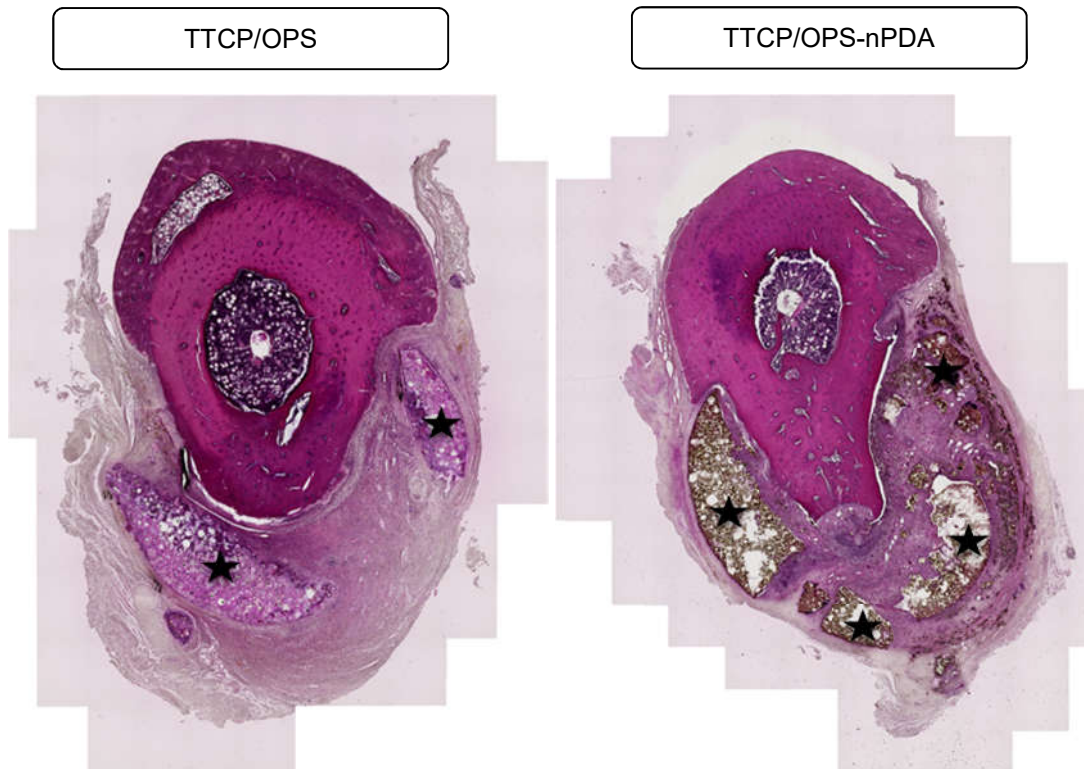


Figure 42 : Coupe histologique non décalcifiée colorée à l'hématoxyline-éosine observée en microscopie optique ( $\times 40$ ) à 12 semaines après encollage par TTCP/OPS-nPDA d'une fracture à la fonction tibio-fibulaire. Il est visualisé une couverture de l'adhésif par du tissu osseux au niveau du tibia.

Dans les groupes avec encollage par TTCP/OPS ou par TTCP/OPS-nPDA, pour les échantillons présentant un échec clinique, il était visualisé une importante réaction inflammatoire à corps étranger entre l'adhésif (TTCP/OPS ou TTC/OPS-nPDA) et l'os mais également entre les fragments d'adhésifs (Figure 43). Cette réaction est exacerbée par la mobilité engendrée par le morcellement de l'adhésif confirmant la nécessité de renforcer sa résistance mécanique.



**Figure 43 :** Coupes histologiques non décalcifiées colorées à l'hématoxyline-éosine observées en microscopie optique ( $\times 10$ ) à 5 semaines après encollage par TTCP/OPS (à gauche) ou TTCP/OPS-nPDA (à droite) d'une fracture à la fonction tibio-fibulaire présentant un échec clinique. Il est visualisé une réaction inflammatoire importante entre l'os et l'adhésif ainsi qu'un morcellement de l'adhésif (marqué par ★) avec du tissu inflammatoire entre les fragments.

#### 4.5.3.4 Conclusion – modèle d'ostéotomie fibulaire

Dans ce modèle d'ostéotomie fibulaire, la contention avec encollage, par TTCP/OPS ou par TTCP/OPS-nPDA, était globalement un échec. Le modèle était conçu comme un modèle à contrainte mécanique faible puisque les charges mécaniques sont supportées par le tibia. Toutefois, en raison de la surface de contact à encoller très réduite entre les deux os et des nombreux muscles présents avec des vecteurs variés, ces forces mécaniques étaient suffisantes pour fracturer l'adhésif et rompre la contention. L'action des nPDA en faveur de l'intégration dans le tissu osseux a toutefois pu être notée, de façon similaire aux modèles décrit ci-dessus.

## 4.6 Fonctionnalisation antibactérienne de l'adhésif par chargement de ciprofloxacine sur les nanoparticules de polydopamine

L'ajout de nPDA dans l'adhésif a une action ostéoconductive, il est en effet retrouvé un recouvrement de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA par de l'os dans les modèles *in vivo*. D'autres fonctionnalités peuvent être ajoutées à l'adhésif à travers les nPDA, notamment une action antibactérienne. La ciprofloxacine (CFX) est utilisée en pratique clinique dans les infections du tissu osseux (207) et peut être chargée sur les nPDA par empilement  $\pi$ - $\pi$  et interactions hydrophobes avec un taux de chargement de 20% environ.

### 4.6.1 Évaluation de la libération de la ciprofloxacine

Une étude pilote du profil de libération a été menée par UV-visible afin de vérifier si la CFX chargée dans les nPDA était bien libérée par l'adhésif. Le profil de libération de la CFX à partir de disques d'adhésif TTCP/OPS-nPDA-CFX (Figure 44) présentait une libération prolongée qui perdurait jusqu'à 48 heures, environ 8% de la CFX chargée étant alors libérée. L'efficacité du dispositif est ainsi démontrée.

Il conviendra toutefois d'évaluer plus finement la libération de CFX sur une plus longue durée avec une méthode de détection plus sensible comme le spectrofluorimètre.

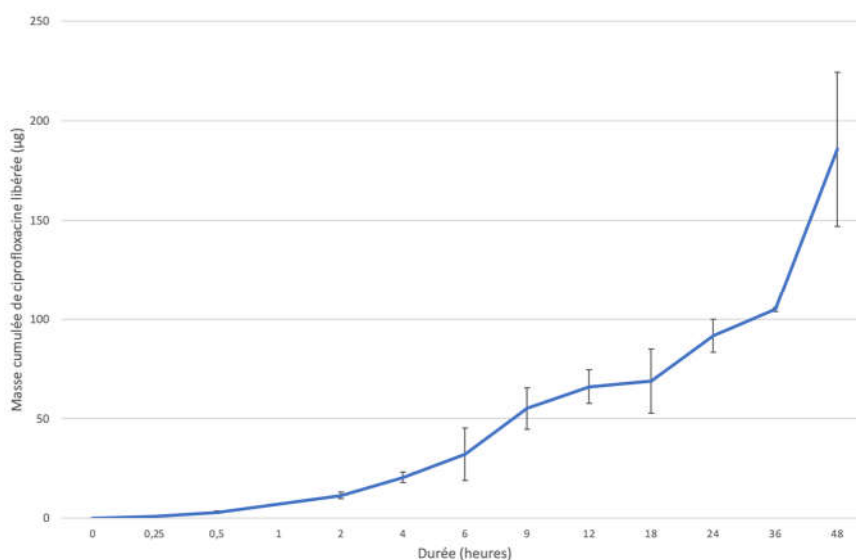


Figure 44 : Profil de libération de la CFX de disques d'adhésif TTCP/OPS-nPDA dont les nPDA ont un taux de chargement en CFX de 20%.

#### 4.6.2 Évaluation microbiologique de l'adhésif comprenant des nPDA fonctionnalisées à la ciprofloxacine

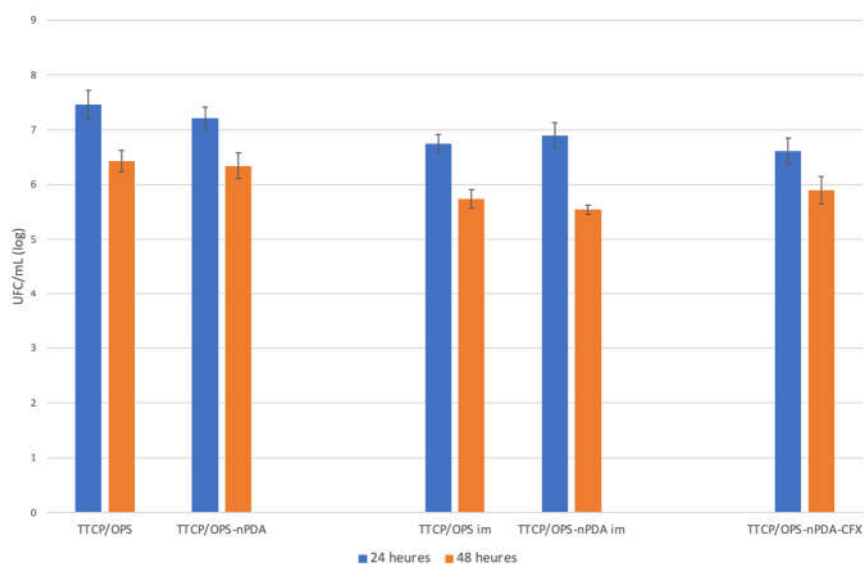
##### 4.6.2.1 Test d'adhésion bactérienne et de croissance planctonique

L'intérêt de la fonctionnalisation des nPDA à la CFX est d'ajouter une action antibactérienne à l'adhésif. Les tests d'adhésion bactérienne et de croissance planctonique, utilisant *Staphylococcus aureus*, ont permis d'évaluer les propriétés bactéricides du matériau.

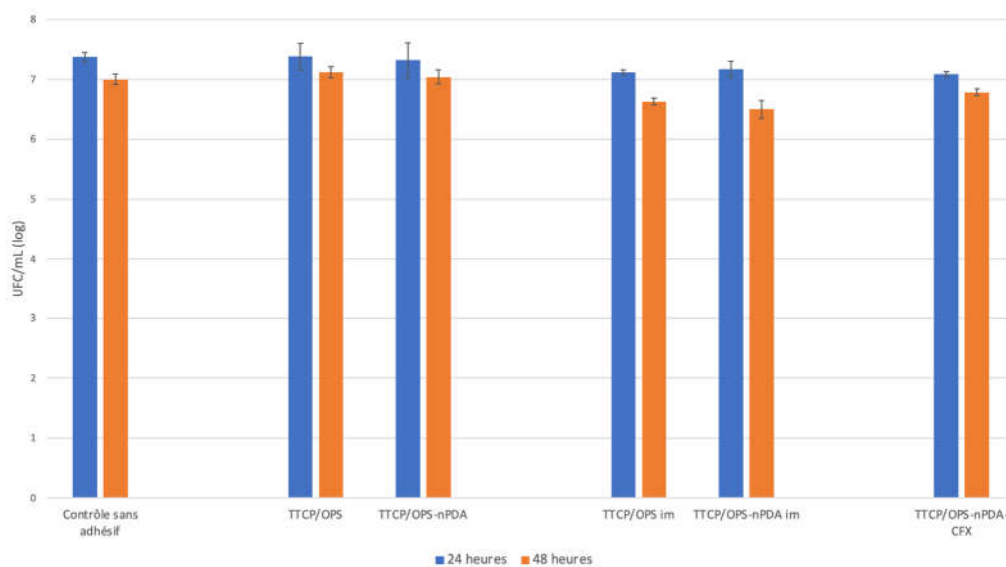
Lors du test d'adhésion bactérienne (Figure 45), la quantité de bactérie ayant adhéré à 24 heures sur les disques dépourvus de CFX ( $7,46 \pm 0,26$  log pour les disques TTCP/OPS et  $7,21 \pm 0,21$  log pour les disques TTCP/OPS-nPDA) semblait légèrement supérieure ( $p > 0,05$ ) aux disques TTCP/OPS-PDA-CFX ( $6,61 \pm 0,23$  log). Les résultats des disques TTCP/OPS-nPDA-CFX étaient similaires ( $p > 0,05$ ) aux résultats obtenus avec des disques d'adhésif immergés ( $_{im}$ ) dans un bain de CFX pendant 1 minute ( $6,75 \pm 0,17$  log pour les disques TTCP/OPS $_{im}$  et de  $6,90 \pm 0,23$  log pour les disques TTCP/OPS-nPDA $_{im}$ ). Les résultats obtenus à 48 heures étaient comparables à ceux obtenus à 24 heures ( $p > 0,05$ ).

Lors du test de croissance planctonique (Figure 46), les constatations étaient similaires. À 24 heures, les populations bactériennes des suspensions dans les groupes dépourvus de CFX ( $7,38 \pm 0,22$  log pour le groupe TTCP/OPS et  $7,32 \pm 0,29$  log pour le groupe TTCP/OPS-nPDA) étaient similaires ( $p > 0,05$ ) à celle du groupe contrôle sans disque d'adhésif ( $7,37 \pm 0,08$  log). Cette population semblait légèrement diminuée ( $p > 0,05$ ) dans les groupes TTCP/OPS $_{im}$  ( $7,12 \pm 0,04$  log à 24 heures), TTCP/OPS-nPDA $_{im}$  ( $7,17 \pm 0,13$  log à 24 heures) et TTCP/OPS-nPDA-CFX ( $7,09 \pm 0,04$  log à 24 heures). Ces trois groupes ne présentaient pas de différence ( $p > 0,05$ ) entre eux. Les résultats obtenus à 48 heures étaient comparables à ceux obtenus à 24 heures ( $p > 0,05$ ).

Ces tests n'ont donc pas démontré d'activité bactéricide significative vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec l'adhésif TTCP/OPS-nPDA-CFX. L'activité bactéricide des antibiotiques est connue pour être concentration-dépendante. La concentration minimale bactéricide (CMB) de la CFX vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* est d'environ  $1 \mu\text{g/mL}$  (232). Lors de ce test, la CFX libérée par les disques d'adhésif chargés en CFX n'a donc clairement pas atteint la CMB. Ce résultat peut s'expliquer par un confinement des nPDA chargées en CFX dans la matrice phosphocalcique qui limite la diffusion de l'agent antibactérien dans le matériau. Toutefois, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la CFX ( $0,25 \mu\text{g/mL}$  vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*) est très inférieure à la CMB. La CMI pourrait donc être atteinte par ces dispositifs et permettre une inhibition de la croissance bactérienne. Cette hypothèse a été vérifiée par le test de diffusion de Kirby-Bauer décrit ci-dessous.



**Figure 45 :** Test d'adhésion bactérienne de *Staphylococcus aureus* en contact de disques d'adhésif évaluant l'effet de l'imprégnation ou de la fonctionnalisation par la ciprofloxacine (CFX) de disques d'adhésif (im signifiant disques immergés dans un bain de CFX pendant 1 minute).

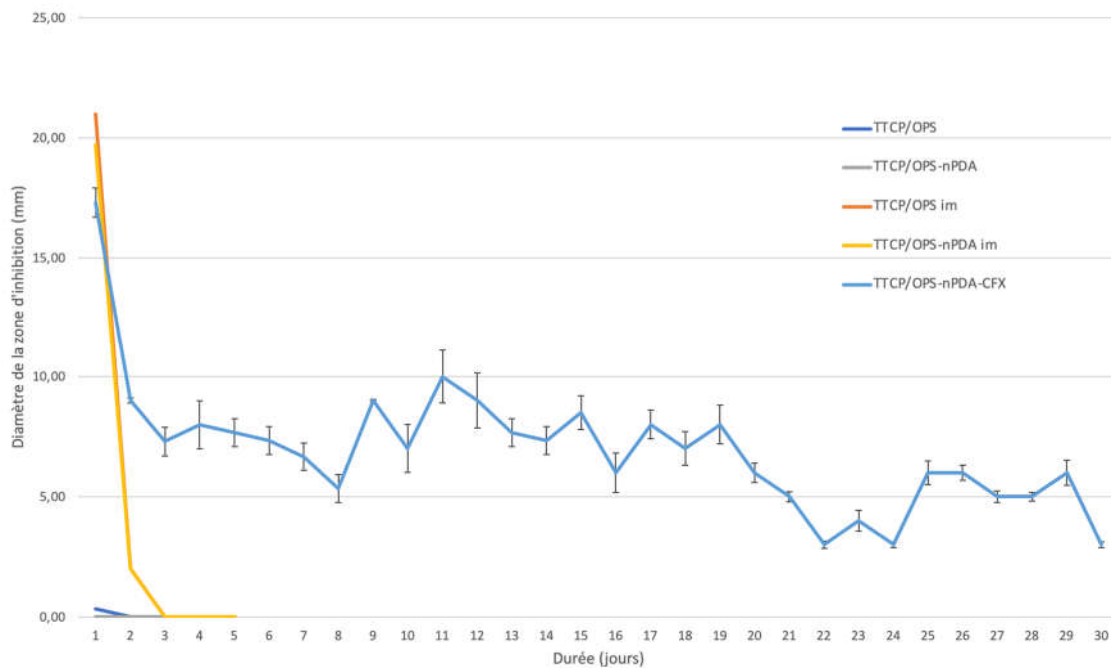


**Figure 46 :** Test de croissance planctonique de *Staphylococcus aureus* en contact de disques d'adhésif évaluant l'effet de l'imprégnation ou de la fonctionnalisation par la ciprofloxacine de disques d'adhésif (im signifiant disques immergés dans un bain de CFX pendant 1 minute).

#### 4.6.2.2 Test de diffusion de Kirby-Bauer

Un test de diffusion ou de zone d'inhibition est un test qualitatif utilisé pour évaluer la capacité d'un matériau à inhiber la croissance bactérienne (effet bactériostatique). Celui-ci a été réalisé sur les différents adhésifs (Figure 47). Les disques témoins (TTCP/OPS et

TTCP/OPS-nPDA) ne présentait aucune zone d'inhibition à 24 heures, démontrant ainsi l'absence d'activité antibactérienne de ces échantillons. Les disques immergés dans un bain de CFX pendant 1 minute présentaient, quant à eux, une zone d'inhibition de 21 mm de diamètre moyen pour le TTCP/OPS<sub>im</sub> et de 19,7 mm de diamètre moyen pour le TTCP/OPS-nPDA<sub>im</sub> à 24 heures, mais ce diamètre diminuait dans les deux cas jusqu'à 0 mm le 3<sup>e</sup> jour. Les adhésifs immergés 1 minute dans la CFX présentaient donc une activité antibactérienne de très courte durée. À l'inverse, les disques fonctionnalisés TTCP/OPS-nPDA-CFX généraient une zone d'inhibition de 17,3 mm de diamètre moyen à 24 heures, et celle-ci se maintenait autour de 5-10 mm de diamètre en moyenne jusqu'au 21<sup>e</sup> jour avant de se réduire à 3 mm de diamètre moyen au bout du 30<sup>e</sup> jour, démontrant ainsi une activité antibactérienne prolongée du dispositif induite par la libération progressive de la CFX depuis les nPDA.



**Figure 47 :** Test de diffusion de disques d'adhésifs sur une gélose inoculée par *Staphylococcus aureus* évaluant l'effet de l'imprégnation ou de la fonctionnalisation par la CFX de disques d'adhésif (<sub>im</sub> signifiant disques immergés dans un bain de CFX pendant 1 minute)

Il est donc démontré que les disques fonctionnalisés TTCP/OPS-nPDA-CFX présentaient une action antibactérienne contrairement aux disques immergés dans un bain de CFX pendant 1 minute. Par conséquent, lorsque les nPDA constitutifs de l'adhésif sont chargés en CFX, un antibiotique à large spectre, le risque d'infection postopératoire pourrait diminuer grâce à une libération localisée et prolongée de la CFX. En effet, l'utilisation d'un implant chargé en CFX a permis de prévenir des infections après prise en charge d'une fracture ouverte dans un modèle de fracture ouverte du fémur avec inoculation bactérienne

chez le rat, démontrant ainsi l'intérêt de ce relargage local (233). Il conviendrait maintenant d'étudier l'action antibactérienne de l'adhésif fonctionnalisé à la CFX dans un modèle animal avec infection afin d'étudier son efficacité *in vivo*.

Par ailleurs, d'autres substances antibactériennes comme des antibiotiques d'une autre famille mais aussi des ions métalliques, des sels d'ammonium quaternaire ou encore le monoxyde d'azote ont déjà été chargés sur des nPDA (234). Des adhésifs comprenant ces substances pourraient ainsi être également étudiés.

Outre l'action antibactérienne, d'autres fonctionnalisations peuvent être envisagées, notamment dans l'objectif de promouvoir la croissance du tissu osseux avec, par exemple, de la *bone morphogenetic protein 2* (BMP2) (235), de l'adénosine (236), des peptides ostéogéniques (237) ou encore la simvastatine. Cette dernière a en effet démontré une amélioration de la régénération osseuse en association avec un ciment phospho-calcique (238,239). Les nPDA offrent ainsi la potentialité d'ajouter diverses propriétés bioactives complémentaires aux l'adhésifs TTCP/OPS-nPDA.





## **5. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE**

---



Les adhésifs sont employés au quotidien dans de nombreux domaines en raison de leur facilité d'utilisation et de leur versatilité. Dans le domaine médical, l'utilisation d'un matériau biorésorbable est toujours préférable à l'implantation définitive pour prendre en charge un problème transitoire comme celui de la consolidation osseuse. En effet, cela permet d'éviter les complications liées à ce matériel sur le long-terme ainsi que les interventions réalisées pour l'ablation des implants. Dès lors, la fixation des fragments osseux par un adhésif biorésorbable semble préférable à la fixation par implants métalliques.

La recherche d'un adhésif présentant les qualités requises a été longtemps sans succès en raison d'obstacles majeurs : la nécessité d'adhérer en milieu humide, l'absence de préparation des surfaces, l'impératif de la biocompatibilité. Si les adhésifs synthétiques ont longtemps été majoritairement étudiés, les adhésifs osseux du futur seront largement inspirés par la nature. En effet, les animaux aquatiques comme le ver *Phragmatopoma californica* ou la moule *Mytilus edulis* sont capables de générer des adhésifs biocompatibles très efficaces en milieu aqueux. Ainsi, il a déjà été démontré que des adhésifs combinant un CPC avec de l'OPS (inspiré de la colle du ver *Phragmatopoma californica*) présentent des propriétés adhésives ainsi qu'une biocompatibilité encourageantes *in vitro* et *ex vivo* (16,17,40,39,22). La chimie de la polydopamine, inspirée des adhésifs de la moule ainsi que du ver *Phragmatopoma californica*, est une autre voie de recherche qui peut être exploitée en raison des excellentes propriétés adhésives de la PDA, essentiellement liées au groupe fonctionnel catéchol. L'ajout de nPDA, riches en groupe catéchol, reconnues pour leurs capacités adhésives et leurs propriétés ostéoinductrices (31–33), semble être pertinent pour améliorer l'adhésif organo-minéral composé de CPC et d'OPS.

Les tests de traction *in vitro* et *ex vivo* réalisés dans ce travail ont confirmé le rôle des nPDA dans le renforcement des propriétés adhésives vis-à-vis de l'os et du titane en comparaison avec un adhésif TTCP/OPS sans nPDA dans un environnement physiologique (aqueux et à 37°C). De plus, les conditions expérimentales de cette étude (surfaces planes sans imbrication, absence de prétraitement des surfaces, immersion dans un liquide) constituaient des conditions particulièrement défavorables pour un adhésif. L'évaluation *in vitro* et *ex vivo* a été ainsi réalisée dans les conditions les plus proches d'une utilisation *in vivo*, ce qui permet d'obtenir des informations les plus fiables possibles quant aux propriétés adhésives de l'adhésif.

Par conséquent, un tel adhésif pourrait être utilisé cliniquement pour fixer des fragments d'os ensemble, mais aussi être utilisé conjointement à des implants métalliques en cas de reconstruction nécessitant de supporter de lourdes charges. De plus, cet adhésif pourrait améliorer la stabilité primaire d'implants métalliques prothétiques comme les implants dentaires ou les prothèses articulaires.

Outre l'adhésion, l'adhésif devrait idéalement promouvoir la formation de tissu osseux pour obtenir une consolidation *ad integrum* sans interposition par un implant artificiel. Les interventions chirurgicales secondaires réalisées pour retirer les implants ne seraient alors plus nécessaires, diminuant ainsi la morbidité et le coût des prises en charge. Les CPC, dont le TTCP utilisé dans ce travail, présentent des propriétés ostéoconductrices reconnues (196,240), ils sont utilisés comme substitut osseux depuis de nombreuses années. D'autre part, l'OPS est présente de façon abondante dans les protéines de la matrice extracellulaire osseuse, elle promeut la différenciation ostéoblastique et participe ainsi à la formation de tissu osseux (172). Le mélange d'OPS et de TTCP avec de l'eau entraîne la formation d'un complexe de calcium phosphosérine monohydrate, un réseau coordonné adhésif, qui initie la calcification osseuse (179). De plus, les nPDA sont ostéo-inductives et génèrent un microenvironnement adapté à l'adhésion et la prolifération cellulaire favorisant la régénération tissulaire et notamment la formation de tissu osseux (31). Le test de biominéralisation au SBF réalisé a bien démontré une minéralisation plus rapide et plus abondante à la surface de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA par rapport à l'adhésif TTCP/OPS. La formulation TTCP/OPS-nPDA combine ainsi les propriétés de promotion du tissu osseux de ses trois composants.

L'intérêt des nPDA, en dehors du renforcement des propriétés adhésives et de la promotion du tissu osseux, réside dans les possibilités de fonctionnalisation par diverses molécules afin d'ajouter d'autres propriétés bioactives à l'adhésif. En effet, les molécules bioactives peuvent interagir avec le réseau polymère constitutifs des nPDA par empilement  $\pi$ - $\pi$  ou par liaison cation- $\pi$ , hydrogène, électrostatique ou hydrophobe (241). Par exemple, l'infection est une complication des fractures, particulièrement des fractures ouvertes (242). Les fractures ouvertes sont notamment fréquentes au niveau du squelette facial puisque l'os est exposé aux cavités orales ou sinusiennes septiques mais elles sont particulièrement graves au niveau des membres. L'infection peut également compliquer toute intervention chirurgicale, malgré le respect des conditions d'asepsie, comprenant donc les ostéotomies (243,244) ou les mise en place de greffes osseuses (245). Le tissu osseux se défend mal contre les infections, ce qui constitue une source de retard ou d'absence de consolidation. De plus, les antibiotiques en prise systémique pénètrent seulement partiellement le tissu osseux, expliquant en partie les difficultés à traiter ces infections (246). Par conséquent, une distribution locale d'agents antibactériens via l'adhésif osseux lui-même pourrait être une stratégie efficace pour éviter les infections.

Dans la littérature, des substances antibactériennes comme des antibiotiques mais aussi des ions métalliques, des sels d'ammonium quaternaire ou encore le monoxyde d'azote ont été chargés sur des nPDA pour générer une activité antibactérienne (234). La ciprofloxacine, quant à elle, est utilisée en pratique clinique dans les infections du tissu osseux

(207). L'intérêt de la libération localisée de CFX par un implant chargé en CFX a été démontré pour prévenir des infections après prise en charge d'une fracture ouverte dans un modèle de fracture ouverte du fémur avec inoculation bactérienne chez le rat (233). Dans ce travail, la CFX a été utilisée comme modèle de molécule bioactive et a été chargée dans les nPDA. Une évaluation microbiologique *in vitro* (test de diffusion) a démontré une action antibactérienne pendant 30 jours de l'adhésif composé de nPDA fonctionnalisée avec la CFX.

D'autres fonctionnalisations de l'adhésif peuvent être envisagées, notamment dans l'objectif de promouvoir la croissance du tissu osseux avec, par exemple, de la *bone morphogenetic protein 2* (BMP2) (235), de l'adénosine (236), des peptides ostéogéniques (237) ou encore la simvastatine. Les nPDA offrent ainsi de multiples possibilités d'ajout de nouvelles fonctions à l'adhésif TTCP/OPS-nPDA.

L'évaluation *in vivo* est une étape primordiale avant la transposition chez l'humain, elle peut constituer un obstacle majeur sur le cheminement de la pailasse au chevet du patient. Peu de modèles animaux ont été décrits pour évaluer l'efficacité d'un adhésif osseux en contexte de contrainte mécanique (38). Les adhésifs organo-minéraux les plus connus, notamment Tetranite® et OsStic™, ont tous été évalués *in vivo* dans des modèles sans contraintes mécaniques (22,39,40).

En revanche, la totalité des trois modèles développés dans ce travail présentaient des contraintes mécaniques. En particulier, le modèle d'ostéotomie tibiale était caractérisé par de très fortes contraintes mécaniques. En effet, chez le rat, le tibia supporte la quasi-totalité des charges mécaniques de la jambe chez le rat (230), qui sont particulièrement élevées par rapport aux autres quadrupèdes ou aux humains (221). Malheureusement, ce modèle d'ostéotomie tibiale a présenté un échec de l'encollage par TTCP/OPS comme par TTCP/OPS-nPDA pour la contention de ces fractures. Même le groupe contrôle, constitué par une ostéosynthèse par plaque Rattfix® en PEEK transvissée a également présenté des échecs par déplacement secondaire dans la moitié des cas. Dans le modèle d'ostéotomie fibulaire, l'encollage par TTCP/OPS comme par TTCP/OPS-nPDA a également présenté un échec pour la contention de ces fractures. Si les contraintes mécaniques étaient plus faibles dans le modèle d'ostéotomie fibulaire, il faut souligner le caractère grêle de l'os fibulaire entouré de muscles puissants de vecteurs variés. La superficie de la surface de contact avec le tibia et donc la surface encollée est très faible.

Par conséquent, l'évaluation *in vivo* en zone contrainte pourrait être mieux réalisée chez un autre animal présentant des charges mécaniques au niveau des membres inférieurs proportionnellement plus faibles avec des surfaces de contact plus importantes afin de se rapprocher des conditions existantes chez l'humain. De plus, le rat ne permet aucune réduction de l'appui en postopératoire puisqu'il ne tolère aucune restriction tandis que la mise

en place d'attelles ou de plâtre peut permettre une reprise de l'appui plus graduelle chez d'autres animaux comme par exemple le mouton (247). En effet, chez l'humain la mise en charge est graduelle même après ostéosynthèse dans de nombreuses fractures des membres comme de la mandibule (222–224).

Dans les deux modèles d'ostéotomies, les échecs d'encollage semblent aussi liés à un défaut de résistance mécanique de l'adhésif entraînant un morcellement par fractures multiples au sein de l'adhésif. Après durcissement, l'adhésif a une structure céramique en raison de sa teneur en TTCP. En effet, les céramiques sont connues pour leur totale absence de ductilité, lorsqu'une force excessive est appliquée, elles fracturent. Il semble donc qu'il faille remédier à ce défaut de résistance intrinsèque de l'adhésif pour lui permettre de supporter des charges mécaniques plus importantes. Par exemple, des fibres résorbables en PLGA (40) ou acide polylactique ou polycaprolactone pourraient améliorer la résistance intrinsèque de l'adhésif en évitant la propagation des microfissures. De plus, leur caractère biorésorbable permet de générer des pores au sein de l'adhésif qui faciliterait la colonisation par le tissu osseux.

Le troisième modèle développé était celui de la fixation d'une autogreffe, qui était placée en apposition sur le tibia et non au sein d'une perte de substance osseuse. Elle est sujette aux contraintes mécaniques engendrées par les contractions des muscles de la jambe. La présence de ces contraintes d'origine musculaire était confirmée par l'échec (déplacement ou perte) des greffons apposés sans fixation. L'encollage par l'adhésif avec ou sans nPDA a permis de fixer l'autogreffe avec tenue mécanique et sans déplacement secondaire dans la majorité des cas, confirmant ainsi les propriétés adhésives vis-à-vis du tissu osseux. L'ajout de nPDA n'a pas montré de différence dans les propriétés adhésives dans ce modèle en comparaison à l'adhésif TTCP/OPS sans nPDA, fort probablement en raison de la petite taille de l'échantillon et de l'importance des variations inter-individuelles. Toutefois, il a été démontré une action de promotion du tissu osseux par les nPDA avec un recouvrement de l'adhésif par du tissu osseux confirmant ainsi sa meilleure intégration comparativement à l'adhésif TTCP/OPS. La présence de cellules et le développement de tissu osseux a été constaté au sein de l'adhésif TTC/OPS signant sa dégradation progressive. En raison d'une limite technique dans la découpe des échantillons histologiques non décalcifiés, une telle démonstration n'a pu être réalisée au sein de l'adhésif TTCP/OPS-nPDA puisque l'intégrité de celui-ci n'a pu être assurée lors du processus de préparation des lames histologiques.

Pour conclure, l'adhésif TTCP/OPS-nPDA présente des capacités adhésives supérieures à l'adhésif TTCP/OPS sur l'os *ex vivo* et le titane *in vitro*. L'évaluation *in vivo* réalisée a confirmé que cet adhésif est biocompatible et permet de fixer des autogreffes osseuses sans autre moyen de fixation en condition de contraintes mécaniques faibles. De

plus, l'ajout de nPDA à l'adhésif entraîne une meilleure promotion de la régénération osseuse. Les nPDA peuvent également servir de plateforme de fonctionnalisation pour ajouter de nouvelles propriétés comme par exemple une action bactérienne par chargement en CFX.

Les perspectives d'amélioration de l'adhésif doivent viser à renforcer sa résistance mécanique intrinsèque pour éviter les fractures lors de l'application de charges mécaniques. Il conviendrait d'essayer d'ajouter des fibres en matériaux résorbables comme le PLGA, l'acide polylactique ou le polycaprolactone.

Pour permettre une translation directe à l'humain, l'évaluation *in vivo* de l'adhésif renforcé pourrait se faire dans un modèle utilisant un animal plus gros comme le mouton ou le porc ce qui permettrait d'améliorer les surfaces de contact, de diminuer les charges sur les membres inférieurs proportionnellement au poids et de réaliser une mise en charge plus progressive.

Il conviendrait de confirmer l'action antibactérienne de l'adhésif fonctionnalisé à la CFX dans un modèle de fixation de fracture ouverte avec inoculation bactérienne. Enfin, d'autres fonctionnalisations, notamment avec des molécules pro-ostéogéniques comme le BMP2 pourraient être étudiées.

L'utilisation d'un adhésif osseux a plusieurs avantages potentiels dans la prise en charge des fractures, particulièrement les fractures comminutives, mais aussi des ostéotomies ou des fixations d'autogreffes. Une adhésion forte à l'os et aux métaux ouvre un large spectre de possibilités dans les domaines de la chirurgie cranio-maxillo-faciale, de la chirurgie orale ou de la chirurgie orthopédique et traumatologique. L'adhésif TTCP/OPS-nPDA développé dans ce travail semble répondre à ces défis avec des résultats prometteurs *in vitro* comme *in vivo*. Une translation finale à l'humain simplifiera les procédures chirurgicales nécessitant une fixation osseuse tout en évitant les interventions secondaires nécessaires à l'ablation des implants métalliques actuels, diminuant ainsi la morbidité et les coûts de prise en charge.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Wu AM, Bisignano C, James SL, Abady GG, Abedi A, Abu-Gharbieh E, et al. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Healthy Longevity*. 2021;2(9):e580-92.
2. Bergin PF, Weber TG, Gerow DE, Spitler CA, Graves ML, Russell GV. Intraosseous Plating for the Management of Cortical Defects. *J Orthop Trauma*. 2018;32 Suppl 1:S12-7.
3. Skroch L, Fischer I, Meisgeier A, Kozolka F, Apitzsch J, Neff A. Condylar remodeling after osteosynthesis of fractures of the condylar head or close to the temporomandibular joint. *J Craniomaxillofac Surg*. 2020;48(4):413-20.
4. Pontell ME, Niklinska EB, Braun SA, Jaeger N, Kelly KJ, Golinko MS. Resorbable Versus Titanium Hardware for Rigid Fixation of Pediatric Upper and Midfacial Fractures: Which Carries a Lower Risk Profile? *J Oral Maxillofac Surg*. 2021;79(10):2103-14.
5. Acklin YP, Bircher A, Morgenstern M, Richards RG, Sommer C. Benefits of hardware removal after plating. *Injury*. 2018;49 Suppl 1:S91-5.
6. Kellam PJ, Harrast J, Weinberg M, Martin DF, Davidson NP, Saltzman CL. Complications of Hardware Removal. *J Bone Joint Surg Am*. 2021;103(22):2089-95.
7. Lalli TAJ, Matthews LJ, Hanselman AE, Hubbard DF, Bramer MA, Santrock RD. Economic impact of syndesmosis hardware removal. *Foot (Edinb)*. 2015;25(3):131-3.
8. Fenelon C, Murphy EP, Galbraith JG, Kearns SR. The burden of hardware removal in ankle fractures: How common is it, why do we do it and what is the cost? A ten-year review. *Foot Ankle Surg*. 2019;25(4):546-9.
9. Howe MS, Keys W, Richards D. Long-term (10-year) dental implant survival: A systematic review and sensitivity meta-analysis. *J Dent*. 2019;84:9-21.
10. Farrar DF. Bone adhesives for trauma surgery: A review of challenges and developments. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2012;33:89-97.
11. Böker KO, Richter K, Jäckle K, Taheri S, Grunwald I, Borchering K, et al. Current State of Bone Adhesives-Necessities and Hurdles. *Materials (Basel)*. 2019;12(23).
12. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*. 2019;46(S21):92-102.
13. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*. 2013;9(9):8037-45.
14. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Böhner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today*. 2016;19(2):69-87.
15. Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater*. 2014;10(3):1035-49.
16. Kirillova A, Kelly C, von Windheim N, Gall K. Bioinspired Mineral-Organic Bioresorbable Bone Adhesive. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(17):e1800467.
17. Pujari-Palmer M, Guo H, Wenner D, Autefage H, Spicer CD, Stevens MM, et al. A Novel Class of Injectable Bioceramics that Glue Tissues and Biomaterials. *Materials (Basel)*. 2018;11(12).
18. Norton MR, Kay GW, Brown MC, Cochran DL. Bone glue - The final frontier for fracture repair and implantable device stabilization. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2020;102:102647.
19. Shao H, Bachus KN, Stewart RJ. A water-borne adhesive modeled after the sandcastle glue of *P. californica*. *Macromol Biosci*. 2009;9(5):464-71.

20. Hulsart-Billström G, Stelzl C, Procter P, Pujari-Palmer M, Insley G, Engqvist H, et al. In vivo safety assessment of a bio-inspired bone adhesive. *J Mater Sci Mater Med*. 2020;31(2):24.
21. Bystrom JL, Pujari-Palmer M. Phosphoserine Functionalized Cements Preserve Metastable Phases, and Reprecipitate Octacalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Dicalcium Phosphate, and Amorphous Calcium Phosphate, during Degradation, In Vitro. *J Funct Biomater*. 2019;10(4).
22. Procter P, Hulsart-Billström G, Alves A, Pujari-Palmer M, Wenner D, Insley G, et al. Gluing Living Bone Using a Biomimetic Bioadhesive: From Initial Cut to Final Healing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:728042.
23. Waite JH. Mussel adhesion - essential footwork. *J Exp Biol*. 2017;220(Pt 4):517-30.
24. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science*. 2007;318(5849):426-30.
25. Kaushik NK, Kaushik N, Pardeshi S, Sharma JG, Lee SH, Choi EH. Biomedical and Clinical Importance of Mussel-Inspired Polymers and Materials. *Mar Drugs*. 2015;13(11):6792-817.
26. Ryu J, Ku SH, Lee H, Park CB. Mussel-Inspired Polydopamine Coating as a Universal Route to Hydroxyapatite Crystallization. *Advanced Functional Materials*. 2010;20(13):2132-9.
27. Huang S, Liang N, Hu Y, Zhou X, Abidi N. Polydopamine-Assisted Surface Modification for Bone Biosubstitutes. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2389895.
28. Wu C, Han P, Liu X, Xu M, Tian T, Chang J, et al. Mussel-inspired bioceramics with self-assembled Ca-P/polydopamine composite nanolayer: Preparation, formation mechanism, improved cellular bioactivity and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(1):428-38.
29. Liu Z, Qu S, Zheng X, Xiong X, Fu R, Tang K, et al. Effect of polydopamine on the biomimetic mineralization of mussel-inspired calcium phosphate cement in vitro. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;44:44-51.
30. Liu Z, Chen J, Zhang G, Zhao J, Fu R, Tang K, et al. Enhanced Repairing of Critical-Sized Calvarial Bone Defects by Mussel-Inspired Calcium Phosphate Cement. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(5):1852-61.
31. Wang Z, Wang K, Zhang Y, Jiang Y, Lu X, Fang L, et al. Protein-Affinitive Polydopamine Nanoparticles as an Efficient Surface Modification Strategy for Versatile Porous Scaffolds Enhancing Tissue Regeneration. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2016;33(2):89-100.
32. Xie X, Tang J, Xing Y, Wang Z, Ding T, Zhang J, et al. Intervention of Polydopamine Assembly and Adhesion on Nanoscale Interfaces: State-of-the-Art Designs and Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*. 2021;10(9):2002138.
33. Ku SH, Ryu J, Hong SK, Lee H, Park CB. General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces. *Biomaterials*. 2010;31(9):2535-41.
34. Liu Y, Ai K, Liu J, Deng M, He Y, Lu L. Dopamine-melanin colloidal nanospheres: an efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for in vivo cancer therapy. *Adv Mater Weinheim*. 2013;25(9):1353-9.
35. Zhang D, Wu M, Zeng Y, Wu L, Wang Q, Han X, et al. Chlorin e6 Conjugated Poly(dopamine) Nanospheres as PDT/PTT Dual-Modal Therapeutic Agents for Enhanced Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(15):8176-87.
36. Bou-Francis A, Ghanem A. Standardized methodology for in vitro assessment of bone-to-bone adhesion strength. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2017;77:96-101.
37. Procter P, Pujari-Palmer M, Hulsart-Billström G, Wenner D, Insley G, Larsson S, et

- al. A biomechanical test model for evaluating osseous and osteochondral tissue adhesives. *BMC Biomed Eng.* 2019;1:11.
38. Van Erk M, Van Luijk J, Yang F, Leeuwenburgh SCG, Sánchez-Fernández MJ, Hermans E, et al. A systematic review and meta-analyses on animal models used in bone adhesive research. *J Orthop Res.* 2021;
39. Foley KT, Woodard EJ, Slotkin JR, Mayotte CK, Baldwin AC, Brown MC, et al. Cranial flap fixation in sheep using a resorbable bone adhesive. *J Neurosurg.* 2020;1-9.
40. Kirillova A, Nillissen O, Liu S, Kelly C, Gall K. Reinforcement and Fatigue of a Bioinspired Mineral-Organic Bioresorbable Bone Adhesive. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(2):e2001058.
41. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-5.
42. Guerguiev-Rüegg B, Stoddart M. Biology and biomechanics in bone healing. In: *AO Principles of Fracture Management. Third Edition.* Thieme; 2017.
43. Rahn B. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: *Bone in clinical orthopedics.* 2nd éd. Thieme; 2002. p. 287-326.
44. Sheen JR, Garla VV. Fracture Healing Overview. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.*
45. Rozeboom AVJ, Dubois L, Bos RRM, Spijker R, de Lange J. Closed treatment of unilateral mandibular condyle fractures in adults: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(4):456-64.
46. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury.* 2014;45 Suppl 2:S3-7.
47. Posnick JC. Orthognathic Surgery: Past - Present - Future. *J Oral Maxillofac Surg.* 2021;79(10):1996-8.
48. Lee DC, Byun SJ. High Tibial Osteotomy. *Knee Surg Relat Res.* 2012;24(2):61-9.
49. Kholaki O, Hammer DA, Schlieve T. Management of Orbital Fractures. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2019;27(2):157-65.
50. Ong AA, Manning JP, Vincent AG, Namin AW, Wang W, Ducic Y. Cranioplasty. *Facial Plast Surg.* 2021;37(6):698-702.
51. Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19(4):455-66, v.
52. Schlund M, Nicot R, Lauwers L, Raoul G, Ferri J. Le Fort 1 osteotomy and calvarial bone grafting for severely resorbed maxillae. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(7):859-67.
53. Choi SW, Bae JY, Shin YH, Song JH, Kim JK. Treatment of forearm diaphyseal non-union: Autologous iliac corticocancellous bone graft and locking plate fixation. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2021;107(8):102833.
54. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, et al. Autogenous bone grafts and bone substitutes--tools and techniques: I. A 20,000-case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116(5 Suppl):6S-24S.
55. LaTrenta GS, McCarthy JG, Breitbart AS, May M, Sissons HA. The role of rigid skeletal fixation in bone-graft augmentation of the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84(4):578-88.
56. Dean A, Alamillos F, Heredero S, Redondo-Camacho A, Guler I, Sanjuan A. Fibula free flap in maxillomandibular reconstruction. Factors related to osteosynthesis plates' complications. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48(10):994-1003.
57. Boc SF, Norem ND. Ankle arthrodesis. *Clin Podiatr Med Surg.* 2012;29(1):103-13.
58. Salzmann SN, Derman PB, Lampe LP, Kueper J, Pan TJ, Yang J, et al. Cervical Spinal Fusion: 16-Year Trends in Epidemiology, Indications, and In-Hospital Outcomes by

- Surgical Approach. *World Neurosurg.* 2018;113:e280-95.
59. Martin BI, Mirza SK, Spina N, Spiker WR, Lawrence B, Brodke DS. Trends in Lumbar Fusion Procedure Rates and Associated Hospital Costs for Degenerative Spinal Diseases in the United States, 2004 to 2015. *Spine (Phila Pa 1976).* 2019;44(5):369-76.
  60. Elani HW, Starr JR, Da Silva JD, Gallucci GO. Trends in Dental Implant Use in the U.S., 1999-2016, and Projections to 2026. *J Dent Res.* 2018;97(13):1424-30.
  61. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet.* 2007;370(9597):1508-19.
  62. Trisi P, Todisco M, Consolo U, Travaglini D. High versus low implant insertion torque: a histologic, histomorphometric, and biomechanical study in the sheep mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(4):837-49.
  63. Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Wimmer MA, Holinka M. Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8046-58.
  64. Kyzas PA, Saeed A, Tabbenor O. The treatment of mandibular condyle fractures: a meta-analysis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(8):e438-452.
  65. Toon DH, Premchand RAX, Sim J, Vaikunthan R. Outcomes and financial implications of intra-articular distal radius fractures: a comparative study of open reduction internal fixation (ORIF) with volar locking plates versus nonoperative management. *J Orthop Traumatol.* 2017;18(3):229-34.
  66. Dhakad RKS, Panwar M, Gupta S. Plating versus conservative treatment in mid shaft fractures of clavicle: A comparative study. *J Clin Orthop Trauma.* 2016;7(Suppl 2):166-70.
  67. Augat P, von Rüden C. Evolution of fracture treatment with bone plates. *Injury.* 2018;49 Suppl 1:S2-7.
  68. Al-Moraissi EA, Ellis E. What method for management of unilateral mandibular angle fractures has the lowest rate of postoperative complications? A systematic review and meta-analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(11):2197-211.
  69. Thorén H, Snäll J, Kormi E, Lindqvist C, Suominen-Taipale L, Törnwall J. Symptomatic plate removal after treatment of facial fractures. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38(7):505-10.
  70. Petrie E. *Handbook of Adhesives and Sealants.* 3e édition. New York: McGraw-Hill Education; 2021. 784 p.
  71. Fay PA. 1 - A history of adhesive bonding. In: Adams RD, éditeur. *Adhesive Bonding (Second Edition).* Woodhead Publishing; 2021. p. 3-40. (Woodhead Publishing Series in Welding and Other Joining Technologies).
  72. Pizzi A, Mittal KL. *Handbook of Adhesive Technology.* 3e édition. Boca Raton: Productivity Press; 2017. 658 p.
  73. Baldan A. Adhesion phenomena in bonded joints. *International Journal of Adhesion and Adhesives.* 2012;38:95-116.
  74. Wilson EE, Awonusi A, Morris MD, Kohn DH, Tecklenburg MMJ, Beck LW. Three Structural Roles for Water in Bone Observed by Solid-State NMR. *Biophys J.* 2006;90(10):3722-31.
  75. Lim JY, Donahue HJ. Biomaterial characteristics important to skeletal tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(4):396-8.
  76. Diallo-Garcia S, Osman MB, Krafft JM, Casale S, Thomas C, Kubo J, et al. Identification of Surface Basic Sites and Acid-Base Pairs of Hydroxyapatite. *J Phys Chem C.* 2014;118(24):12744-57.
  77. Bittencourt AFB, Mendes PCD, Valença GP, Da Silva JLF. Acid-base properties of hydroxyapatite(0001) by the adsorption of probe molecules: An ab initio investigation. *Phys Rev Materials.* 2021;5(7):075003.

78. Weiss H. Adhesion of advanced overlay coatings: mechanisms and quantitative assessment. *Surface and Coatings Technology*. 1995;71(2):201-7.
79. Wake WC. *Adhesion and the Formulation of Adhesives*. London: Applied Science Publishers; 1982. 332 p.
80. Good RJ. Theory of “cohesive” vs “adhesive” separation in an adhering system. *J Adhesion*. 1972;4(133-154).
81. Pocius AV. *Adhesion and Adhesives Technology: An Introduction*. 3rd edition. Munich : Cincinnati: Hanser Publications; 2012. 370 p.
82. Bailey A. The science and technology of electrostatic powder spraying, transport and coating. 1998;45(2):85-120.
83. Horenstein M. Electrostatics and nanoparticles: What’s the same, what’s different? *Journal of Electrostatics*. 2009;67:384-93.
84. Temin SC. Pressure-Sensitive Adhesives for Tapes and Labels. In: Skeist I, éditeur. *Handbook of Adhesives*. Boston, MA: Springer US; 1990. p. 641-63.
85. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 2015;2015:e421746.
86. Cowin SC. *Bone Mechanics Handbook*. 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001. 980 p.
87. Brand RA, Mont MA, Manring MM. Biographical sketch: Themistocles Gluck (1853-1942). *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(6):1525-7.
88. Browne M. *Practical Taxidermy: Manual of instruction to the amateur in collecting, preserving, and setting up natural history specimens of all kinds, to which is added a chapter upon the pictorial arrangement of museums*. London: Upcott Gill; 1884.
89. Simmons JE. *Fluid Preservation: A Comprehensive Reference*. Lanham: Rowman & Littlefield Publishers; 2014. 364 p.
90. Donkerwolcke M, Burny F, Muster D. Tissues and bone adhesives--historical aspects. *Biomaterials*. 1998;19(16):1461-6.
91. Munson FT, Heron DF. Facial reconstruction with acrylic resin. *The American Journal of Surgery*. 1941;53(2):291-5.
92. Scales JT, Herschell W. Perspex in Orthopaedics. *Br Med J*. 1945;2(4421):423-4.
93. Judet J, Judet R. The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. *J Bone Joint Surg Br*. 1950;32-B(2):166-73.
94. Haboush EJ. A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast-setting dental acrylic, and other considerations. *Bull Hosp Joint Dis*. 1953;14(2):242-77.
95. Mumme T, Gravius S, Andereya S, Marx R, Wirtz DC, Müller-Rath R. Improvement of the long-term adhesive strength between bone cement and bone in cemented cup arthroplasty: ex-vivo study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2007;127(6):409-16.
96. Smith DC. Medical and dental applications of cements. *J Biomed Mater Res*. 1971;5(2):189-205.
97. Frazer RQ, Byron RT, Osborne PB, West KP. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15(6):629-39.
98. Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride-Gagyi S. Masquelet’s induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *J Orthop Res*. 2021;39(4):707-18.
99. Morelli I, Drago L, George DA, Gallazzi E, Scarponi S, Romanò CL. Masquelet technique: myth or reality? A systematic review and meta-analysis. *Injury*. 2016;47 Suppl 6:S68-76.
100. Glaser HT. The local effect upon bone, cartilage and joint tissues of the

- polymerization of methyl methacrylate in situ. *Surg Forum*. 1957;8:550-4.
101. Leão R de S, Maior JRS, Lemos CA de A, Vasconcelos BC do E, Montes MAJR, Pellizzer EP, et al. Complications with PMMA compared with other materials used in cranioplasty: a systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res*. 2018;32:e31.
  102. Sakai T, Morita S, Shinomiya K i, Watanabe A, Nakabayashi N, Ishihara K. In vivo evaluation of the bond strength of adhesive 4-META/MMA-TBB bone cement under weight-bearing conditions. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(1):128-34.
  103. Sugita Y, Okubo T, Saita M, Ishijima M, Torii Y, Tanaka M, et al. Novel Osteogenic Behaviors around Hydrophilic and Radical-Free 4-META/MMA-TBB: Implications of an Osseointegrating Bone Cement. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):E2405.
  104. Morotomi T, Hirata-Tsuchiya S, Washio A, Kitamura C. Effects of 4-META/MMA-TBB Resin at Different Curing Stages on Osteoblasts and Gingival Epithelial Cells. *J Adhes Dent*. 2016;18(2):111-8.
  105. Quan R, Ni Y, Zhang L, Xu J, Zheng X, Yang D. Short- and long-term effects of vertebroplastic bone cement on cancellous bone. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014;35:102-10.
  106. Yoshida S, Sugii H, Itoyama T, Kadowaki M, Hasegawa D, Tomokiyo A, et al. Development of a novel direct dental pulp-capping material using 4-META/MMA-TBB resin with nano hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;130:112426.
  107. Masaka N, Yoneda S, Masaka K. An up to 43-year longitudinal study of fixed prosthetic restorations retained with 4-META/MMA-TBB resin cement or zinc phosphate cement. *J Prosthet Dent*. 2021;S0022-3913(21)00212-2.
  108. Endres K, Marx R, Tinschert J, Wirtz DC, Stoll C, Riediger D, et al. A new adhesive technique for internal fixation in midfacial surgery. *Biomed Eng Online*. 2008;7:16.
  109. Smeets R, Marx R, Kolk A, Said-Yekta S, Grosjean MB, Stoll C, et al. In vitro study of adhesive polymethylmethacrylate bone cement bonding to cortical bone in maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(12):3028-33.
  110. Smeets R, Endres K, Stockbrink G, Hanken H, Hermanns-Sachweh B, Marx R, et al. The innovative application of a novel bone adhesive for facial fracture osteosynthesis-in vitro and in vivo results. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(7):2058-66.
  111. Manoukian OS, Sardashti N, Stedman T, Gailiunas K, Ojha A, Penalosa A, et al. Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: Narayan R, éditeur. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Oxford: Elsevier; 2019. p. 462-82.
  112. Shahbazi S, Moztarzadeh F, Sadeghi GMM, Jafari Y. In vitro study of a new biodegradable nanocomposite based on poly propylene fumarate as bone glue. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;69:1201-9.
  113. Wang L, Zhang G qing, He X hai, Cui Y dong, ur Rehman Lashari N, Guo D gang, et al. In vitro biocompatibility and mechanical properties of bone adhesive tape composite based on poly(butyl fumarate)/poly(propylene fumarate)-diacrylate networks. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2022;126:105049.
  114. Guan X, Wei T, Cai J, Sun J, Yu S, Guo D. Poly(propylene fumarate)-Based Adhesives with a Transformable Adhesion Force for Suture-Free Fixation of Soft Tissue Wounds. *ACS Appl Polym Mater*. 11 mars 2022;4(3):1855-66.
  115. Wistlich L, Rücker A, Schamel M, Kübler AC, Gbureck U, Groll J. A Bone Glue with Sustained Adhesion under Wet Conditions. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(3).
  116. Coover HW, Dreifus DW, O'Connor JT. Cyanoacrylate Adhesives. In: Skeist I, éditeur. *Handbook of Adhesives*. Boston, MA: Springer US; 1990. p. 463-77.
  117. Collins JA, James PM, Levitsky SA, Bredenburg CE, Anderson RW, Leonard F, et al. Cyanoacrylate adhesives as topical hemostatic aids. II. Clinical use in seven combat casualties. *Surgery*. 1969;65(2):260-3.

118. Parsi K, Roberts S, Kang M, Benson S, Baker L, Berman I, et al. Cyanoacrylate closure for peripheral veins: Consensus document of the Australasian College of Phlebology. *Phlebology*. 2020;35(3):153-75.
119. Collins JA, Pani KC, Seidenstein MM, Brandes G, Leonard F. Cyanoacrylate adhesives as topical hemostatic aids. I. Experimental evaluation on liver wounds in dogs. *Surgery*. 1969;65(2):256-9.
120. Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990;116(5):546-50.
121. Kandalam U, Bouvier AJ, Casas SB, Smith RL, Gallego AM, Rothrock JK, et al. Novel bone adhesives: a comparison of bond strengths in vitro. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(9):1054-9.
122. Mehta MJ, Shah KH, Bhatt RG. Osteosynthesis of mandibular fractures with N-butyl cyanoacrylate: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987;45(5):393-6.
123. Hochuli-Vieira E, Engler Pinto ACB, Pereira-Filho VA, Saska S, Monnazzi MS. Adhesives based on butyl-cyanoacrylate for fixation of autologous bone graft: Pilot study in rabbits. *Dent Traumatol*. 2017;33(4):261-8.
124. de Oliveira Neto PJ, Cricchio G, Hawthorne AC, Okamoto R, Sennerby L, Lungren S, et al. Tomographic, histological, and immunohistochemical evidences on the use of N-butyl-2-cyanoacrylate for onlay graft fixation in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012;14(6):861-71.
125. Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, Gabrielli MFR, Capela MV, Gabrielli M a. C. Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(2):180-6.
126. Esteves JC, Monteiro JM, Aranega AM, Betoni Junior W, Sonoda CK. Utilization of ethyl cyanoacrylate and 2-octyl cyanoacrylate adhesives for autogenous bone graft fixation: histomorphometric study in rats. *J Oral Implantol*. 2014;40(4):411-7.
127. Kay EB. Early years in artificial valve development. *Ann Thorac Surg*. 1989;48(3 Suppl):S24-25.
128. di Pompeo FS, Paolini G, Firmani G, Sorotos M. History of breast implants: Back to the future. *JPRAS Open*. 2022;32:166-77.
129. Redler I. Polymer Osteosynthesis: A Clinical Trial of Ostamer in Forty-two Patients. *JBJS*. 1962;44(8):1621-52.
130. Fedak PWM, Kieser TM, Maitland AM, Holland M, Kasatkin A, Leblanc P, et al. Adhesive-enhanced sternal closure to improve postoperative functional recovery: a pilot, randomized controlled trial. *Ann Thorac Surg*. 2011;92(4):1444-50.
131. Ball CG, Grondin SC, Pasiaka JL, Kirkpatrick AW, MacLean AR, Cattle P, et al. Examples of dramatic failures and their effectiveness in modern surgical disciplines: can we learn from our mistakes? *Journal of Comparative Effectiveness Research*. 2018;7(7):709-20.
132. Schreder KJ, Bayer IS, Milner DJ, Loth E, Jasiuk I. A polyurethane-based nanocomposite biocompatible bone adhesive. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013;127(6):4974-82.
133. Granskog V, García-Gallego S, Kieseritzky J von, Rosendahl J, Stenlund P, Zhang Y, et al. High-Performance Thiol–Ene Composites Unveil a New Era of Adhesives Suited for Bone Repair. *Advanced Functional Materials*. 2018;28(26):1800372.
134. Arseneault M, Granskog V, Khosravi S, Heckler IM, Mesa-Antunez P, Hult D, et al. The Dawn of Thiol–Yne Triazine Triones Thermosets as a New Material Platform Suited for Hard Tissue Repair. *Adv Mater Weinheim*. 2018;30(52):e1804966.
135. Hutchinson DJ, Granskog V, von Kieseritzky J, Alfort H, Stenlund P, Zhang Y, et al. Highly Customizable Bone Fracture Fixation through the Marriage of Composites and

- Screws. *Advanced Functional Materials*. 2021;31(41):2105187.
136. Jain R, Wairkar S. Recent developments and clinical applications of surgical glues: An overview. *Int J Biol Macromol*. 2019;137:95-106.
  137. Toriumi DM, Chung VK, Cappelle QM. Surgical Adhesives in Facial Plastic Surgery. *Otolaryngol Clin North Am*. 2016;49(3):585-99.
  138. Weber SC, Chapman MW. Adhesives in orthopaedic surgery. A review of the literature and in vitro bonding strengths of bone-bonding agents. *Clin Orthop Relat Res*. 1984;(191):249-61.
  139. Chivers RA, Wolowacz RG. The strength of adhesive-bonded tissue joints. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 1997;17(2):127-32.
  140. Graham LD, Glattauer V, Huson MG, Maxwell JM, Knott RB, White JW, et al. Characterization of a protein-based adhesive elastomer secreted by the Australian frog *Notaden bennetti*. *Biomacromolecules*. 2005;6(6):3300-12.
  141. Deming TJ. Mussel byssus and biomolecular materials. *Curr Opin Chem Biol*. 1999;3(1):100-5.
  142. Burzio LO, Burzio VA, Silva T, Burzio LA, Pardo J. Environmental bioadhesion: themes and applications. *Curr Opin Biotechnol*. 1997;8(3):309-12.
  143. Szomor ZL, Murrell GAC, Appleyard RC, Tyler MJ. Meniscal repair with a new biological glue: An ex vivo study. *Techniques in Knee Surgery*. 2008;7(4):261-5.
  144. Graham LD, Danon SJ, Johnson G, Braybrook C, Hart NK, Varley RJ, et al. Biocompatibility and modification of the protein-based adhesive secreted by the Australian frog *Notaden bennetti*. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(2):429-41.
  145. Hoffmann B, Volkmer E, Kokott A, Augat P, Ohnmacht M, Sedlmayr N, et al. Characterisation of a new bioadhesive system based on polysaccharides with the potential to be used as bone glue. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(10):2001-9.
  146. Pinzón LM, Cedano FJ, Castro CI, Briceño JC, Casas JP, Tabima DM, et al. Formulation and characterization of chitosan-based biocomposites with potential use for bone adhesion. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2017;66(14):697-707.
  147. Vargas Villanueva JG, Sarmiento Huertas PA, Galan FS, Esteban Rueda RJ, Briceño Triana JC, Casas Rodriguez JP. Bio-adhesion evaluation of a chitosan-based bone bio-adhesive. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2019;92:80-8.
  148. Bai S, Zhang X, Cai P, Huang X, Huang Y, Liu R, et al. A silk-based sealant with tough adhesion for instant hemostasis of bleeding tissues. *Nanoscale Horiz*. 2019;4(6):1333-41.
  149. Bai S, Zhang X, Lv X, Zhang M, Huang X, Shi Y, et al. Bioinspired Mineral–Organic Bone Adhesives for Stable Fracture Fixation and Accelerated Bone Regeneration. *Advanced Functional Materials*. 2020;30(5):1908381.
  150. Wei W, Yu J, Gebbie MA, Tan Y, Martinez Rodriguez NR, Israelachvili JN, et al. Bridging adhesion of mussel-inspired peptides: role of charge, chain length, and surface type. *Langmuir*. 2015;31(3):1105-12.
  151. Ahn BK. Perspectives on Mussel-Inspired Wet Adhesion. *J Am Chem Soc*. 2017;139(30):10166-71.
  152. Brubaker CE, Messersmith PB. Enzymatically degradable mussel-inspired adhesive hydrogel. *Biomacromolecules*. 2011;12(12):4326-34.
  153. Kim BJ, Oh DX, Kim S, Seo JH, Hwang DS, Masic A, et al. Mussel-mimetic protein-based adhesive hydrogel. *Biomacromolecules*. 2014;15(5):1579-85.
  154. Waite JH, Andersen NH, Jewhurst S, Sun C. Mussel Adhesion: Finding the Tricks Worth Mimicking. *The Journal of Adhesion*. 2005;81(3-4):297-317.
  155. Roberts SC, Brilliant JD. Tricalcium phosphate as an adjunct to apical closure in

- pulpless permanent teeth. *J Endod.* 1975;1(8):263-9.
156. Grover LM, Gbureck U, Farrar D, Barralet JE. Adhesion of a Novel Calcium Phosphate Cement to Cortical Bone and Several Common Biomaterials. *Key Engineering Materials.* 2006;309-311:849-52.
157. Kanter B, Geffers M, Ignatius A, Gbureck U. Control of in vivo mineral bone cement degradation. *Acta Biomater.* 2014;10(7):3279-87.
158. Klammert U, Ignatius A, Wolfram U, Reuther T, Gbureck U. In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta Biomater.* 2011;7(9):3469-75.
159. Waselau M, Samii VF, Weisbrode SE, Litsky AS, Bertone AL. Effects of a magnesium adhesive cement on bone stability and healing following a metatarsal osteotomy in horses. *Am J Vet Res.* 2007;68(4):370-8.
160. Brückner T, Meininger M, Groll J, Kübler AC, Gbureck U. Magnesium Phosphate Cement as Mineral Bone Adhesive. *Materials (Basel).* 2019;12(23):E3819.
161. Heilig P, Jordan MC, Paul MM, Kupczyk E, Meffert RH, Gbureck U, et al. Augmentation of suture anchors with magnesium phosphate cement - Simple technique with striking effect. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022;128:105096.
162. Fuchs A, Kreczy D, Brückner T, Gbureck U, Stahlhut P, Bengel M, et al. Bone regeneration capacity of newly developed spherical magnesium phosphate cement granules. *Clin Oral Investig.* 2022;26(3):2619-33.
163. Kaiser F, Schröter L, Stein S, Krüger B, Weichhold J, Stahlhut P, et al. Accelerated bone regeneration through rational design of magnesium phosphate cements. *Acta Biomater.* 2022;145:358-71.
164. Abou Neel EA, Salih V, Revell PA, Young AM. Brushite and Self-Healing Flexible Polymer-Modified Brushite Bone Adhesives for Fibular Osteotomy Repair. *Advanced Engineering Materials.* 2014;16(2):218-30.
165. Stevens MJ, Steren RE, Hlady V, Stewart RJ. Multiscale structure of the underwater adhesive of *Phragmatopoma californica*: a nanostructured latex with a steep microporosity gradient. *Langmuir.* 2007;23(9):5045-9.
166. Shao H, Stewart RJ. Biomimetic underwater adhesives with environmentally triggered setting mechanisms. *Adv Mater Weinheim.* 2010;22(6):729-33.
167. Stewart RJ, Wang CS, Shao H. Complex coacervates as a foundation for synthetic underwater adhesives. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;167(1-2):85-93.
168. Sun C, Fantner GE, Adams J, Hansma PK, Waite JH. The role of calcium and magnesium in the concrete tubes of the sandcastle worm. *J Exp Biol.* 2007;210(Pt 8):1481-8.
169. Winslow BD, Shao H, Stewart RJ, Tresco PA. Biocompatibility of adhesive complex coacervates modeled after the sandcastle glue of *Phragmatopoma californica* for craniofacial reconstruction. *Biomaterials.* 2010;31(36):9373-81.
170. Dompé M, Cedano-Serrano FJ, Heckert O, van den Heuvel N, van der Gucht J, Tran Y, et al. Thermoresponsive Complex Coacervate-Based Underwater Adhesive. *Adv Mater.* 2019;31(21):e1808179.
171. Kim S, Cui ZK, Fan J, Fartash A, Aghaloo TL, Lee M. Photocrosslinkable chitosan hydrogels functionalized with the RGD peptide and phosphoserine to enhance osteogenesis. *J Mater Chem B.* 2016;4(31):5289-98.
172. Ying X, Chen X, Cheng S, Guo X, Chen H, Xu HZ. Phosphoserine promotes osteogenic differentiation of human adipose stromal cells through bone morphogenetic protein signalling. *Cell Biol Int.* 2014;38(3):309-17.
173. Zhang M, Liu M, Bewick S, Suo Z. Nanoparticles to increase adhesive properties of biologically secreted materials for surface affixing. *J Biomed Nanotechnol.* juin 2009;5(3):294-9.

174. Good RJ, Hawa AK. Acid/Base Components in the Molecular Theory of Adhesion. *The Journal of Adhesion*. 1997;63(1-3):5-13.
175. Willett RL, Baldwin KW, West KW, Pfeiffer LN. Differential adhesion of amino acids to inorganic surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7817-22.
176. Olsson J, Hellsten M, Holmberg K. Surface modification of hydroxyapatite to avoid bacterial adhesion. *Colloid Polym Sci*. 1 déc 1991;269(12):1295-302.
177. Cui X, Koujima Y, Seto H, Murakami T, Hoshino Y, Miura Y. Inhibition of Bacterial Adhesion on Hydroxyapatite Model Teeth by Surface Modification with PEGMA-Phosmer Copolymers. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(2):205-12.
178. Mostafa NY, Kamel MM. Enhancement of adhesion bonding between titanium metal and electrodeposited calcium phosphate. *Surf Engin Appl Electrochem*. 2016;52(6):520-3.
179. Kesseli FP, Lauer CS, Baker I, Mirica KA, Van Citters DW. Identification of a calcium phosphoserine coordination network in an adhesive organo-apatitic bone cement system. *Acta Biomater*. 2020;105:280-9.
180. Geddes AT, Thatcher GP, Hetzel S, McCabe RP, Vandereby R, Snyder CJ. Biomechanical Testing of a Calcium Phosphate-Phosphoserine–Based Mineral–Organic Adhesive for Non-invasive Fracture Repair of Mandibular Fractures in Dogs. *Front Vet Sci*. 2020;7:59.
181. Pickrell BB, Hollier LH. Evidence-Based Medicine: Mandible Fractures. *Plast Reconstr Surg*. 2017;140(1):192e-200e.
182. Cochran DL, Jones A, Sugita R, Brown MC, Guda T, Prasad H, et al. Immediate Dental Implant Stabilization in a Canine Model Using a Novel Mineral–Organic Adhesive: 4-Month Results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(1):39-51.
183. Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. *Biomaterials*. 2022;23(15):3063-72.
184. Pujari-Palmer M, Giró R, Procter P, Bojan A, Insley G, Engqvist H. Factors That Determine the Adhesive Strength in a Bioinspired Bone Tissue Adhesive. *ChemEngineering*. 2020;4(1):19.
185. Wu D, Pujari-Palmer M, Bojan A, Palmquist A, Procter P, Öhman-Mägi C, et al. The effect of two types of resorbable augmentation materials – a cement and an adhesive – on the screw pullout resistance in human trabecular bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2020;110:103897.
186. Bojan AJ, Stadelmann VA, Wu D, Pujari-Palmer M, Insley G, Sundh D, et al. A new bone adhesive candidate- does it work in human bone? An ex-vivo preclinical evaluation in fresh human osteoporotic femoral head bone. *Injury*. 2022;S0020-1383(22)00281-9.
187. Clark RAF. Fibrin glue for wound repair: facts and fancy. *Thromb Haemost*. 2003;90(6):1003-6.
188. Vrchovecká K, Pávková-Goldbergová M, Engqvist H, Pujari-Palmer M. Cytocompatibility and Bioactive Ion Release Profiles of Phosphoserine Bone Adhesive: Bridge from In Vitro to In Vivo. *Biomedicines*. 2022;10(4):736.
189. Liebscher J, Mrówczyński R, Scheidt HA, Filip C, Hädade ND, Turcu R, et al. Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story? *Langmuir*. 2013;29(33):10539-48.
190. Lyngé ME, Westen R van der, Postma A, Städler B. Polydopamine—a nature-inspired polymer coating for biomedical science. *Nanoscale*. 2011;3(12):4916-28.
191. Cedano Serrano FJ, Pinzón LM, Narváez DM, Castro Paéz CI, Moreno-Serrano CL, Tabima DM, et al. Evaluation of a water-resistant and biocompatible adhesive with potential use in bone fractures. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2017;31(13):1480-95.
192. Palacio EP, Pereira GJC, Silveiras PR de A, Stasi GGD, Staut C de A, Sardenberg T. The effects of ethyl-2-cyanoacrylate and butyl-2-cyanoacrylate in the process of bone healing in rats. A controlled experimental study. *Rev Bras Ortop*. 2018;53(1):53-9.

193. Ginebra MP, Fernández E, Boltong MG, Bermúdez O, Planell JA, Driessens FC. Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with the short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clin Mater.* 1994;17(2):99-104.
194. Rutala WA, Weber DJ, Healthcare, Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*, 2008. CDC. 2008;163.
195. Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, et al. Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials.* 2013;34(22):5530-7.
196. Eliaz N, Metoki N. *Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications.* Materials (Basel). 2017;10(4).
197. Mills LA, Simpson AHRW. In vivo models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br.* 2012;94(7):865-74.
198. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S56-65.
199. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone.* 2011;49(4):591-9.
200. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a « gold standard »? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent.* 2017;3(1):23.
201. Cawood JI, Stoelinga PJW, International Academy for Oral and Facial Rehabilitation. International academy for oral and facial rehabilitation--Consensus Report. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(3):195-8.
202. Depeyre A, Touzet-Roumazielle S, Lauwers L, Raoul G, Ferri J. Retrospective evaluation of 211 patients with maxillofacial reconstruction using parietal bone graft for implants insertion. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(9):1162-9.
203. Barone R, Pavaux C, Blin PC. *Atlas d'Anatomie du Lapin.* Masson; 1973. 219 p.
204. Ju KY, Lee Y, Lee S, Park SB, Lee JK. Bioinspired Polymerization of Dopamine to Generate Melanin-Like Nanoparticles Having an Excellent Free-Radical-Scavenging Property. *Biomacromolecules.* 2011;12(3):625-32.
205. Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials.* 1991;12(2):155-63.
206. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* 2006;27(15):2907-15.
207. Majalekar PP, Shirote PJ. Fluoroquinolones: Blessings Or Curses. *Curr Drug Targets.* 2020;21(13):1354-70.
208. Cheng H, Chen BPH, Soleas IM, Ferko NC, Cameron CG, Hinoul P. Prolonged Operative Duration Increases Risk of Surgical Site Infections: A Systematic Review. *Surg Infect (Larchmt).* 2017;18(6):722-35.
209. Short HL, Fevrier HB, Meisel JA, Santore MT, Heiss KF, Wulkan ML, et al. Defining the association between operative time and outcomes in children's surgery. *J Pediatr Surg.* 2017;52(10):1561-6.
210. Abd El-Hamid H, Radwan MM, Abo-Almaged HH. In Vitro Bioactivity Study of Calcium Aluminate/Calcium Phosphate. *Interceram - Int Ceram Rev.* 2019;68(1):36-43.
211. Kwon KD, Chang JS, Lee SH, Lee DH, Lee KS, Hwang JH, et al. The Effect of Cefazolin on Mechanical Properties and Antibacterial Reactions of Calcium Phosphate Cement. *The Journal of the Korean Orthopaedic Association.* 2011;273-81.
212. Takadama H, Hashimoto M, Mizuno M, Kokubo T. Round-robin test of SBF for in

- vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phosphorus Research Bulletin*. 2004;17:119-25.
213. Huang Y, Li Y, Hu Z, Yue X, Proetto MT, Jones Y, et al. Mimicking Melanosomes: Polydopamine Nanoparticles as Artificial Microparasols. *ACS Cent Sci*. 2017;3(6):564-9.
214. Nieto C, Vega MA, Enrique J, Marcelo G, Martín del Valle EM. Size Matters in the Cytotoxicity of Polydopamine Nanoparticles in Different Types of Tumors. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11).
215. Nieto C, Vega MA, Marcelo G, Valle EMM del. Polydopamine nanoparticles kill cancer cells. *RSC Adv*. 2018;8(63):36201-8.
216. Hu D, Zou L, Li B, Hu M, Ye W, Ji J. Photothermal Killing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Bacteria-Targeted Polydopamine Nanoparticles with Nano-Localized Hyperpyrexia. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019;5(10):5169-79.
217. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Gutknecht WF. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol*. 1978;14(4):644-53.
218. Hong S, Na YS, Choi S, Song IT, Kim WY, Lee H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Advanced Functional Materials*. 2012;22(22):4711-7.
219. Buckley RE, Moran CG, Apivatthakakul T. AO Philosophy and evolution. In: *AO Principles of Fracture Management*. Third Edition. Thieme; 2017.
220. Barbosa de Toledo Lourenço PR. Tibia, shaft. In: *AO Principles of fracture management*. Third edition. Thieme; 2017.
221. Wehner T, Wolfram U, Henzler T, Niemeyer F, Claes L, Simon U. Internal forces and moments in the femur of the rat during gait. *J Biomech*. 2010;43(13):2473-9.
222. Kubiak EN, Beebe MJ, North K, Hitchcock R, Potter MQ. Early weight bearing after lower extremity fractures in adults. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013;21(12):727-38.
223. Arnold JB, Tu CG, Phan TM, Rickman M, Varghese VD, Thewlis D, et al. Characteristics of postoperative weight bearing and management protocols for tibial plateau fractures: Findings from a scoping review. *Injury*. 2017;48(12):2634-42.
224. Manzie T, David MC, Bobinskas A. Return to normal diet following mandibular fractures - how long is long enough? *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2021;59(9):1050-5.
225. Savaridas T, Wallace RJ, Muir AY, Salter DM, Simpson AHRW. The development of a novel model of direct fracture healing in the rat. *Bone Joint Res*. 2012;1(11):289-96.
226. Meyers N, Sukopp M, Jäger R, Steiner M, Matthys R, Lapatki B, et al. Characterization of interfragmentary motion associated with common osteosynthesis devices for rat fracture healing studies. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176735.
227. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100.
228. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132.
229. Honl M, Rentzsch R, Müller G, Brandt C, Bluhm A, Hille E, et al. The use of water-jetting technology in prostheses revision surgery-first results of parameter studies on bone and bone cement. *J Biomed Mater Res*. 2000;53(6):781-90.
230. Moss ML. A functional analysis of fusion of the tibia and fibula in the rat and mouse. *Acta Anat (Basel)*. 1977;97(3):321-32.
231. Armstrong RB, Phelps RO. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *American Journal of Anatomy*. 1984;171(3):259-72.

232. Smith SM, Eng RH. Activity of ciprofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(5):688-91.
233. Kobata SI, Teixeira LEM, Fernandes SOA, Faraco AAG, Vidigal PVT, Araújo ID de. Prevention of bone infection after open fracture using a chitosan with ciprofloxacin implant in animal model. *Acta Cir Bras*. 2020;35(8):e202000803.
234. Fu Y, Yang L, Zhang J, Hu J, Duan G, Liu X, et al. Polydopamine antibacterial materials. *Mater Horiz*. 2021;8(6):1618-33.
235. Ko E, Yang K, Shin J, Cho SW. Polydopamine-assisted osteoinductive peptide immobilization of polymer scaffolds for enhanced bone regeneration by human adipose-derived stem cells. *Biomacromolecules*. 2013;14(9):3202-13.
236. Ahmad T, Byun H, Shin HJ, Lee J, Madhurakkat Perikamana SK, Kim EM, et al. Polydopamine-assisted one-step modification of nanofiber surfaces with adenosine to tune the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and the maturation of osteoclasts. *Biomater Sci*. 2020;8(10):2825-39.
237. Pountos I, Panteli M, Lampropoulos A, Jones E, Calori GM, Giannoudis PV. The role of peptides in bone healing and regeneration: a systematic review. *BMC Medicine*. 2016;14(1):103.
238. Yin H, Li YG, Si M, Li JM. Simvastatin-loaded macroporous calcium phosphate cement: preparation, in vitro characterization, and evaluation of in vivo performance. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(11):2991-3000.
239. Cruz R, Pesce G, Calasans-Maia J, Moraschini V, Calasans-Maia MD, Granjeiro JM. Calcium Phosphate Carrying Simvastatin Enhances Bone Regeneration: A Systematic Review. *Braz Dent J*. 2020;31(2):93-102.
240. Moseke C, Gbureck U. Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater*. 2010;6(10):3815-23.
241. Yeroslavsky G, Girshevitz O, Foster-Frey J, Donovan DM, Rahimpour S. Antibacterial and antibiofilm surfaces through polydopamine-assisted immobilization of lysostaphin as an antibacterial enzyme. *Langmuir*. 2015;31(3):1064-73.
242. Depypere M, Morgenstern M, Kuehl R, Senneville E, Moriarty TF, Obremskey WT, et al. Pathogenesis and management of fracture-related infection. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(5):572-8.
243. Anagnostakos K, Mosser P, Kohn D. Infections after high tibial osteotomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21(1):161-9.
244. Ferri J, Druelle C, Schlund M, Bricout N, Nicot R. Complications in orthognathic surgery: A retrospective study of 5025 cases. *Int Orthod*. 2019;17(4):789-98.
245. Schlund M, Meeus J, Politis C, Ferri J. Management of sinus graft infection-a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2022;51(5):690-8.
246. Thabit AK, Fatani DF, Bamakhrama MS, Barnawi OA, Basudan LO, Alhejaili SF. Antibiotic penetration into bone and joints: An updated review. *Int J Infect Dis*. 2019;81:128-36.
247. Challis MJ, Gaston P, Wilson K, Jull GA, Crawford R. Cyclic pneumatic soft-tissue compression accelerates the union of distal radial osteotomies in an ovine model. *J Bone Joint Surg Br*. 2006;88(3):411-5.



## **ANNEXES**

---



## Annexe 1 : Brevet d'invention – Requête en délivrance



**BREVET D'INVENTION**  
*Code de la propriété intellectuelle - Livre VI*  
**REQUETE EN DELIVRANCE**

**Numéro d'enregistrement :** FR2113780  
**Lieu de dépôt :** 92 INPI - Dépôt électronique  
**Date de la demande :** 17/12/2021  
**Référence client :** B21101866FR MGO/FSP  
**Type de brevet :** Brevet français  
**Demande provisoire :** Non

### Rubrique 1 : NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**Société/Cabinet :** Plasseraud IP  
**Nom/Prénom :** Monsieur NIEMANN Frédérique  
**Adresse :**  
66 rue de la Chaussée d'Antin  
75440 PARIS CEDEX 09  
France

### Rubrique 2 : TITRE DE L'INVENTION

**Titre :** Composition adhésive osseuse

### Rubrique 3 : PRIORITÉS

Néant

### Rubrique 4 : DEMANDEURS

#### Rubrique 4 - 1 : DEMANDEURS (Personne Morale)

**Dénomination sociale :** INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)  
**Forme juridique :** Etablissement public national à caractère administratif  
**N°SIREN :**  
180036048

**Adresse :**  
101, rue de Tolbiac  
75013 PARIS  
France

#### Rubrique 4 - 2 : DEMANDEURS (Personne Morale)

**Dénomination sociale :** CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE LILLE

**Forme juridique :** Etablissement public hospitalier

**N°SIREN :**

265906719

**Adresse :**

2 avenue Oscar Lambret  
59000 LILLE  
France

**Rubrique 4 - 3 : DEMANDEURS (Personne Morale)**

**Dénomination sociale :** UNIVERSITE DE LILLE

**Forme juridique :** Etablissement Public National à caractère scientifique, culturel et professionnel

**N°SIREN :**

130023583

**Adresse :**

42 Rue Paul Duez  
59000 LILLE  
France

**Rubrique 4 - 4 : DEMANDEURS (Personne Morale)**

**Dénomination sociale :** INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR L'AGRICULTURE,  
L'ALIMENTATION ET L'ENVIRONNEMENT

**Forme juridique :** Etablissement public national à caractère administratif

**N°SIREN :**

180070039

**Adresse :**

28 rue du Docteur Finlay  
75015 PARIS  
France

**Rubrique 4 - 5 : DEMANDEURS (Personne Morale)**

**Dénomination sociale :** CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS -

**Forme juridique :** Etablissement Public, Scientifique et Technologique (EPST)

**N°SIREN :**

180089013

**Adresse :**

3, rue Michel Ange  
75016 PARIS  
France

**Rubrique 4 - 6 : DEMANDEURS (Personne Morale)**

**Dénomination sociale :** CENTRALE LILLE INSTITUT

**Forme juridique :** Etablissement Public à caractère industriel et commercial

**N°SIREN :**

195903497

**Adresse :**

Cité scientifique  
59650 VILLENEUVE D'ASCQ  
France

**Rubrique 5 : MANDATAIRE**

**Société/Cabinet :** Plasseraud IP  
**Nom/Prénom :** Monsieur NIEMANN Frédérique  
**Qualité :** CPI brevets  
**N°CPI :** 09-0660  
**Adresse :**

66 rue de la Chaussée d'Antin  
75440 PARIS CEDEX 09  
France

**Rubrique 6 : RENVOI À UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

**Renvoi à une demande de brevet déjà déposée :** Non

**Rubrique 7 : RAPPORT DE RECHERCHE EQUIVALENT**

Néant

**Rubrique 8 : RÉDUCTION DES REDEVANCES**

**Bénéficiaire de la réduction des redevances :** Non

**Rubrique 9 : DÉPÔT DE MATIÈRE BIOLOGIQUE**

Néant

**Rubrique 10 : SÉQUENCES DE NUCLÉOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS**

**La demande contient une liste de séquences :** Non

**Rubrique 11 : DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS**

N°	Type de document	Fichier électronique	Détails
1	Contenu de la demande DOCX	2021.12.08 - BONES - projet de demande complète_prêt pour dépôt.docx	
2	Contenu de la demande PDF	2021.12.08 - BONES - projet de demande complète_prêt pour dépôt.docx.pdf	
3	Contenu de la demande ZIP	2021.12.08 - BONES - projet de demande complète_prêt pour dépôt.docx.zip	
4	Contenu de la demande XML	application-body.xml	

**Rubrique 12 : DEMANDE DE DÉLIVRANCE ACCÉLÉRÉE**

Demande de délivrance accélérée : Non

**Rubrique 13 : EXTENSION DE LA PROTECTION**

Extension de la protection à la Polynésie Française : Non

**Rubrique 14 : PAIEMENT DES REDEVANCES**

Mode de paiement : Compte Client

Prestation	Tarif	Quantité	Total
Revendication, à partir de la 11ème (tarif normal)	42	2	84
Dépôt d'une demande de brevet / certificat d'utilité sous forme électronique	26	1	26
Rapport de recherche	520	1	520
<b>Total (EURO) :</b>			<b>630</b>

**Rubrique 15 : DATE ET SIGNATURE**

Nom/Prénom : Monsieur NIEMANN Frédérique

Qualité : CPI

N°CPI : 09-0660

Date de signature : 17/12/2021

Ce document récapitule les données du dépôt déclarées conformes par le signataire.



## Annexe 2 – Financement Start-AIRR (81 500€)



Région  
**Hauts-de-France**

Le Président  
La Vice-Président

Monsieur Jean-Christophe CAMART  
Président de l'Université de Lille  
42 rue Paul Duez  
59000 LILLE

Réf : DRESS-2021-005625  
Dossier suivi par : Céline MIROUX  
Tél : +33374270929  
Mail : celine.miroux@hautsdefrance.fr

Lille, le 19 AVR. 2021

Objet : Projet « COLLOS »

ch

Monsieur le Président,

Votre projet intitulé « COLLOS - Développement d'une colle (ou un adhésif) innovante bio-inspirée pour la fixation osseuse » a été retenu au titre du dispositif Start-AIRR.

Nous avons le plaisir de vous informer du soutien financier régional d'un montant de 81 500 € au titre de ce projet, dans le cadre de la convention de partenariat 2015-2020 entre la Région Hauts-de-France et Bpifrance portant sur la constitution du Fonds Régional Recherche Innovation : "FRRRI Hauts-de-France".

Vous recevrez prochainement de la part de Bpifrance, gestionnaire de ce fonds, une notification de conventionnement accompagnée de l'acte d'engagement détaillant les conditions générales et particulières ainsi que les modalités de financement rattachées à cette aide régionale.

Comme le prévoit la loi, nous vous informons que vous pouvez exercer un recours à l'encontre de la présente décision devant le Tribunal Administratif de Lille, dans un délai de deux mois, à compter de cette notification.

Nous vous prions d'agréer, Monsieur le Président, l'expression de notre considération distinguée.

**Daniel LECA**  
Vice-Président à l'Enseignement Supérieur,  
la Recherche, l'Europe et le contrat de plan Etat-  
Région

*En 2 vng*

**Xavier BERTRAND**

Copie adressée à : Feng CHAI, coordonnatrice du projet



151, avenue du Président Hoover - 59555 Lille Cedex - Accès métro : Lille Grand Palais  
Tél. (0)3 74 27 00 00 – fax (0)3 74 27 00 05 - hautsdefrance.fr

Conformément aux articles 36 et suivants de la loi 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée, le droit d'accès et de rectification des informations vous concernant s'exerce auprès du Correspondant Informatique et Libertés de la Région Hauts-de-France

## Annexe 3 – Financement BQI (10 000€)



Affaire suivie par Muriel Mazzuca  
Chargée d'Affaires  
Service de la Valorisation Économique de la Recherche  
muriel.mazzuca@univ-lille.fr  
Ligne directe 03.62.26.80.94

**La Vice-Présidente Valorisation et Innovation**

à

**Madame Feng CHAI  
U1008**

Lille, le 11 décembre 2019

**Objet : BQI 2020**

Madame,

J'ai le plaisir de vous annoncer que votre projet "Développement d'un adhésif innovant bio-inspiré pour la fixation osseuse" déposé dans le cadre de l'Appel à Projets "BQI 2020" a été retenu pour un financement en 2020, par la Commission Recherche de l'Université de Lille qui s'est réunie le 27 novembre 2019.

Le montant alloué par l'Université est de 10 000 €.

Je vous informe que Madame Amélie Méresse (amelie.meresse@univ-lille.fr) sera votre interlocutrice pour la prise en charge financière de cette subvention par la Direction de la Mise en Œuvre de la Politique Scientifique.

Les crédits alloués sont annuels et seront ouverts en janvier 2020 sachant que les dépenses seront éligibles jusqu'en décembre 2020.

Tel que prévu dans l'appel à projets, un rapport vous sera demandé, pour le 1<sup>er</sup> mars 2021 au plus tard.

Je reste à votre disposition pour tout complément d'information,

Et vous prie de croire, Madame, à l'expression de mes salutations distinguées.

**Séverine CASALIS**

S. 27

 Cité Scientifique - Bât. A3  
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex  
vaio-recherche@univ-lille.fr



# RÉSUMÉ/ABSTRACT – VERSION GRAND PUBLIC

---

La fixation de fragments osseux entre eux est nécessaire pour réparer une fracture ou pour fixer une greffe d'os servant à reconstruire une zone défectueuse. Actuellement, cette fixation est assurée par des vis et des plaques métalliques qui peuvent entraîner des complications et qui peuvent nécessiter une deuxième intervention chirurgicale pour les retirer. Un adhésif osseux biorésorbable serait ainsi une excellente alternative pour relever ces défis. L'objectif de ce travail est de développer un adhésif osseux organo-minéral bio-inspiré enrichi par des nanoparticules de polydopamine (nPDA).

Cet adhésif a démontré des propriétés mécaniques et biologiques adaptées à la fixation du tissu osseux dans les zones de faibles contraintes. De plus, l'adhésif peut être fonctionnalisé par l'intermédiaire des nPDA afin de présenter une action antibactérienne. Un renforcement mécanique de l'adhésif permettrait d'envisager son utilisation en zone de forte contrainte mécanique.

*Bone fragment fixation is necessary to repair a fracture or stabilize a bone graft used to reconstruct a bone defect. Currently, metallic screws and plates are used to fix bone, however, they are responsible of various complications and often require secondary removal surgeries. A bioresorbable bone adhesive would then be a promising candidate to overcome these challenges. The aim of this study is to develop a bioinspired organo-mineral bone adhesive, enriched by nanoparticles of polydopamine (nPDA).*

*This adhesive demonstrated biocompatibility and mechanical properties suited to the fixation of bone tissue in areas of low mechanical load. Moreover, nPDA could be used as a functionalization platform to offer new biological activities, e.g. antibacterial activity via antibiotics loading. Enhancing the mechanical strength of the adhesive would make it possible to use it in areas of high mechanical load.*