

Université de Montréal

**Développement d'un implant solide biodégradable
à base d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose,
pour la libération contrôlée d'un principe actif**

par

CYRIL DÉSÉVAUX

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en sciences pharmaceutiques
option technologie pharmaceutique

Août, 2002

© Cyril Désévaux, 2002

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Développement d'un implant solide biodégradable à base d'amidon réticulé
à teneur élevée en amylose, pour la libération contrôlée d'un principe actif

présentée par :

CYRIL DÉSÉVAUX

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Daniel Lamontagne, président-rapporteur
Pr. Pascal Dubreuil, directeur de recherche
Pr. Christiane Girard, co-directrice
Pr. Jean-Christophe Leroux, co-directeur
Dr. Vincent Lenaerts, membre du jury
Pr. Robert Marchessault, examinateur externe
Pr. Michael Buschmann, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'amidon réticulé à teneur élevée en amylose (Contramid[®]) est une matrice hydrophile à gonflement qui fut initialement développée pour des formes orales à libération contrôlée de médicament. Le but des travaux de ce doctorat était d'évaluer le Contramid[®] comme matrice d'un implant à libération contrôlée.

Après implantation du Contramid[®], la réponse de l'hôte a été évaluée pendant six mois chez la souris et la libération d'hexénoyl-trans-3-hGRF(1-44)NH₂ (Hex-hGRF) pendant un mois chez le porc, respectivement. Chaque souris a reçu un implant placebo sous-cutané. Les porcs ont reçu 15 mg Hex-hGRF soit : 1) un implant 100% Hex-hGRF, 2) quatre implants 30/70% Hex-hGRF/Contramid[®], ou 3) huit implants 15/85% Hex-hGRF/Contramid[®]. Un quatrième groupe a reçu deux injections de Hex-hGRF à 10 µg/kg pendant cinq jours. Le facteur 1 de croissance insulino-mimétique (IGF-I) sérique a été dosé pendant un mois. Chez la souris, les réactions inflammatoires macroscopique et microscopique sont restées locales. Les polymorphonucléaires et macrophages prédominaient respectivement à l'intérieur et autour de l'implant. De fins septas fibrovasculaires ont fini par subdiviser l'implant progressivement phagocyté par les macrophages. Chez tous les porcs implantés, les concentrations d'IGF-I ont augmenté pendant dix jours. Le pic sérique initial observé dans le groupe quotidiennement injecté a été évité dans les deux groupes à implants Contramid[®] mais pas dans le groupe à implants purs.

La biocompatibilité et biodégradation du Contramid[®] ont été davantage étudiées chez le rat avec des implantations sous-cutanées et intramusculaires. Aux sites d'implantation, des observations macroscopiques ont été effectuées dans le temps et les tissus ont été prélevés pour examen histologique. Aucune réaction inflammatoire macroscopique n'a été relevée. À l'échelle microscopique, la réaction inflammatoire était modérée et très localisée. La dégradation des implants Contramid[®] débutait par une fragmentation associée aux septas fibrovasculaires puis continuait avec la phagocytose par les macrophages pour obtenir une résorption quasi complète à quatre mois.

Ensuite, la libération de ciprofloxacine (CFX) par le Contramid[®] a été évaluée in vitro. Douze formulations furent préparées : Contramid[®] contrôle ; Contramid[®] avec 1% d'huile végétale hydrogénée (HVO) ; et Contramid[®] avec 10 ou 20% d'hydroxypropyl-méthylcellulose (HPMC), chacune avec une charge de 2.5, 5.0 et 7.5% CFX. Ces implants furent testés en dissolution de 24 heures pour évaluer le gonflement, l'érosion, la prise d'eau et la libération de CFX. Les implants 1%-HVO ont aussi été testés en dissolution prolongée. En fonction de son pourcentage, le HPMC augmente la vitesse de libération de CFX, le gonflement, l'érosion et la prise d'eau alors que le HVO n'a aucun effet. Dans tous les tests de dissolution, le pourcentage relatif de CFX libéré diminue avec l'augmentation de la charge initiale de l'implant. Parmi les différentes formulations, la plus longue libération de CFX (> trois semaines) fut obtenue avec les implants 7.5%-CFX/1%-HVO, sans effet de décharge initiale.

Enfin, différentes charges de CFX dans les implants Contramid[®], ont été évaluées in vivo. Six implants 2.5%-CFX, deux 7.5, un 15.0 ou un 20.0 ont été administrés le long de fémurs de lapins, pour déterminer les concentrations systémiques versus locales de CFX pendant un mois. Après implantation, le sang, le muscle, le fémur et le polymère résiduel ont été prélevés dans le temps pour doser la CFX dans ces milieux respectifs. Les concentrations sériques de CFX ont toujours été faibles. L'augmentation de la charge a permis une libération de CFX plus élevée et plus durable, avec des concentrations locales largement supérieures à la concentration minimale inhibitrice pendant 28 jours pour les implants 20.0%-CFX.

Il a ainsi été démontré que le Contramid[®] est un matériau biocompatible et résorbable qui peut être utilisé en tant qu'implant à libération contrôlée d'un agent antibactérien pour la prévention et/ou le traitement de l'ostéomyélite.

Mots-clés : amidon réticulé, implant, biocompatibilité, biodégradation, libération contrôlée, thérapie localisée.

Abstract

Cross-linked high amylose starch (Contramid[®]) is a hydrophilic swelling matrix that was originally developed for controlled release solid oral dosage forms. The purpose of this doctorate work was to evaluate Contramid[®] as a carrier of drug delivery implant.

Initially, Contramid[®] was investigated for evaluation of host response in mice and of hexenoyl-trans-3-hGRF(1-44)NH₂ (Hex-hGRF) delivery in pigs. Mice were administered subcutaneously one placebo Contramid[®] implant and host reaction was evaluated over six months. Pigs were administered 15 mg Hex-hGRF: 1) one pure Hex-hGRF implant, 2) four 30/70 w/w Hex-hGRF/Contramid[®] implants or 3) eight 15/85 w/w Hex-hGRF/Contramid[®] implants. A fourth group was injected twice daily with 10 µg/kg of Hex-hGRF over five days. Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) was monitored over one month. In mice, macroscopic and microscopic inflammatory reactions were always localized. Polymorphonuclear cells and macrophages predominated within and around implants, respectively. Thin fibrovascular septa eventually subdivided Contramid[®] implants, which were progressively phagocytosed by macrophages. In pigs, serum IGF-I concentrations were increased over a ten day period in all implanted groups. The initial IGF-I peak observed in the daily injected group was avoided in both Contramid[®] implant groups but not in the pure Hex-hGRF implant group.

The Contramid[®] biocompatibility and degradation characteristics were further investigated over four months with subcutaneous and intramuscular implants in rats. Macroscopic observations of implantation sites were performed over time and tissue samples were removed for histologic examination. No macroscopic inflammatory reaction was observed. Microscopically, inflammatory reaction was moderate and restricted to implantation sites. Degradation of Contramid[®] implants was characterized with fragmentation by fibrovascular septa and phagocytosis by macrophages. Contramid[®] was mostly absorbed by the end of the four-month period.

Then, Contramid[®] was assessed for *in vitro* ciprofloxacin (CFX) delivery. Twelve formulations were prepared: control Contramid[®]; Contramid[®] with 1% hydrogenated vegetable oil (HVO); and Contramid[®] with 10 or 20% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), each of them with three CFX loadings (2.5, 5.0 and 7.5%). All implants were used for 24-hour dissolution tests to evaluate swelling, erosion, water uptake and CFX release. Additionally, 1%-HVO Contramid[®] implants were used for an extended dissolution test. The presence of HPMC increased CFX release rate, swelling, erosion and water uptake in a concentration-dependent manner whereas HVO had no effect. With increasing drug loading, a decrease of cumulative CFX percent release was observed in both 24-hour and extended dissolution tests. Of the different formulations tested, 7.5%-CFX/1%-HVO implants provided the longest period of drug delivery (> three weeks) without any initial burst effect.

At last, various CFX loadings of Contramid[®] implants were tested *in vivo*. Rabbits were administered six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants along the femur to determine systemic versus local CFX concentrations over one month. After implantation, blood, muscle, femur and residual polymer were collected after over time for CFX assay. Serum CFX concentrations were low regardless of implant loading. Increased drug loading resulted in a higher and longer release of CFX with local concentrations largely in excess of the minimal inhibition concentration over 28 days for 20.0%-CFX implants.

Therefore, it has been demonstrated that Contramid[®] is a biocompatible and absorbable material, which can be used as a sustained antimicrobial delivery implant for local prevention and/or treatment of osteomyelitis.

Keywords : cross-linked starch, implant, biocompatibility, biodegradation, controlled release, localized therapy.

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et toute ma reconnaissance envers le Professeur Pascal Dubreuil d'avoir accepté la lourde responsabilité de diriger mon programme de doctorat, rôle qu'il a accompli avec beaucoup de brio. Dès le début, il a fait preuve d'une grande confiance en moi, et n'a jamais cessé de la manifester au cours de ces années doctorales. C'est pourquoi je me suis toujours fait un devoir de lui rendre cette confiance et de lui porter tout le respect qu'il mérite. Son expérience riche en recherche clinique, son esprit d'analyse critique, sa rigueur scientifique implacable, son honnêteté exemplaire et son sang froid désarmant, lui ont permis d'appliquer un encadrement parfait tout en conservant une humilité qui impose le respect. Par ses conseils opportuns, il a su me mener vers la bonne direction, y compris dans mes pires moments de confusion où j'ai pu être récalcitrant à souhait. Je tiens absolument à souligner que j'ai eu le privilège de faire partie des personnes qui ont développé une excellente relation et une grande complicité avec leur directeur de thèse. Cette réussite est tout à son honneur parce qu'il n'avait pas, de nous deux, le rôle le plus facile.

J'ai aussi une reconnaissance infinie auprès de Docteur Vincent Lenaerts, sans qui, je n'aurais jamais eu l'occasion de compléter un doctorat dans le domaine aussi palpitant que celui de la libération contrôlée des médicaments. J'ai profité d'un apprentissage hors pair en côtoyant un véritable artiste en la matière. Il s'est toujours assuré de la survie de mon doctorat et donc de moi-même, par pure philanthropie. Je suis tout à fait conscient de la chance qu'il a donné à ma carrière professionnelle. Je ne pourrai jamais oublier ce geste et j'aurai donc toujours une dette envers lui. Il m'a démontré qu'il était possible de développer une amitié en parallèle d'une relation professionnelle, concept auquel je refusais d'adhérer auparavant. Enfin, sachant que je ne pouvais aucunement me mesurer à lui dans son art, je n'ai pu le défier qu'en appuyant fort sur mes pédales à l'occasion de trop rares sorties cyclistes.

Je présente mes hommages au Professeur Christiane Girard, co-directrice de ce programme de doctorat. Je tiens à m'incliner devant cette Dame chez qui, derrière une simplicité naturelle et exemplaire, se cache une grande expérience en histocompatibilité. Ses compétences indéniables ont permis de mener à bien la première partie de mon doctorat dont tout le reste dépendait. Sa bonne humeur, sa quiétude, sa compréhension et surtout son oreille attentive ont su désamorcer mes moments de stress et de désarroi au cours de ce doctorat.

Je voudrais remercier le Professeur Jean-Christophe Leroux d'avoir accepté la fonction de co-directeur pour m'avoir permis d'évoluer et d'accomplir mon doctorat dans le monde de la pharmacie.

Je suis honoré de l'acceptation du Professeur Daniel Lamontagne pour assumer la fonction de Président du jury d'évaluation de cette thèse. Je lui sais gré d'avoir fait preuve d'une grande ouverture d'esprit en m'autorisant à entrer à la Faculté de pharmacie.

Je remercie le Professeur Robert Marchessault d'avoir accepté la fonction d'examineur externe dans le jury d'évaluation. Avec sa grande expérience sur l'étude des polymères incluant celle sur le Contramid[®], son intervention ne peut qu'apporter de la valeur au contenu de cette thèse.

Je remercie Labopharm d'avoir subventionné ce projet du début jusqu'à la fin, ce qui m'a évité bon nombre de tracas financiers et m'a permis de concentrer mes efforts exclusivement sur les travaux de recherche. Je souligne par la même occasion, le support financier du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, qui a subvenu à mes besoins personnels pendant une partie de ce doctorat.

Je dois remercier le personnel du laboratoire de Labopharm (Bergar pour les initiés) avec qui j'ai partagé de nombreuses heures sur les paillasse. Ces personnes m'ont fait

découvrir un monde que je ne soupçonnais même pas et m'ont enseigné avec beaucoup de patience et de professionnalisme leur savoir-faire.

Je dois aussi remercier le personnel de l'animalerie et particulièrement Normand Lacasse, pour la précieuse assistance qui a permis le bon déroulement de toutes mes expériences avec les animaux. Je veux souligner la grande dévotion du personnel animalier de la Faculté de médecine vétérinaire, qui a sauvé l'étude des porcs, en restant fidèle au poste dans des conditions particulièrement difficiles à cause de la tempête de verglas qui a frappé la région de St-Hyacinthe en janvier 1998.

Je remercie Guy Beauchamp pour son aide plus que significative dans l'élaboration des analyses statistiques des différentes études.

Je remercie d'une part Jacinthe Cardin, Line Pepin, Bibiane Pépin et Jules Deslandes pour leur support dans la préparation des nombreuses lames histologiques, et d'autre part Luc Moquin et Marco Langlois pour les avoir immortalisées sous forme d'illustrations.

Je remercie Miloud Rahmouni, mon compagnon d'armes au PhD, pour son amitié, sa complicité et toutes les discussions débordantes d'idées sur la technologie pharmaceutique, que nous voulions mettre au point. Avec sa logique et son assurance, il m'a éclairé sur le monde merveilleux des propriétés physico-chimiques des polymères. Grâce à sa formation d'ingénieur chimiste, j'ai aussi beaucoup appris sur la granulation du couscous et l'oxygénation du thé vert. Il est certainement la personne à avoir le mieux compris le parcours du combattant que j'ai accompli puisqu'il se trouve actuellement dans la même situation, c'est-à-dire devoir battre deux fers à la fois, emploi et études. Je sais qu'il a toute la détermination nécessaire pour en venir à bout et je lui souhaite de tout cœur que ce soit le plus tôt possible.

Enfin, je garde mes derniers remerciements et non les moindres, à mes amis. Si tous mes remerciements étaient sincères depuis le début, ceux-ci sont certainement les plus sensibles et les plus chaleureux mais peut-être les plus difficiles à exprimer. Vous avez aidé à l'accomplissement de ce doctorat, de proche ou de loin, parce que vous avez interagi positivement dans cette période importante de ma vie. Merci Jean, Laura, Sylvain, Claude, Scilla, Sonia, Cricri et les autres. Comme ce pourrait être un titre de film, j'ai placé tout ce monde qui m'est cher, dans l'ordre d'apparition dans ma vie à l'instar d'un générique de fin. Merci à tous de votre Amitié. Je n'ai pas aimé mentionner « les autres » mais comme je ne peux malheureusement pas citer tout le monde, c'est le meilleur moyen de n'oublier personne.

*À mes parents,
qui ont su me donner les ailes nécessaires
pour réussir mon envol dans la vie,
tout en sachant la peine qu'ils auraient le
jour de me voir partir au loin.
En remerciement de ce beau geste,
cette thèse leur est dédiée.*

*À Karine,
une Femme d'exception
qui a fait preuve d'une compréhension
fascinante face à cette thèse accaparante,
et qui m'a donné le second souffle pour
achever ce travail de longue haleine.*

Quelquefois, au milieu d'une bataille qui semble interminable, le guerrier a une idée subite et parvient à vaincre en quelques secondes. Alors il pense: "Pourquoi ai-je souffert aussi longtemps dans un combat que je pouvais régler avec moitié moins d'énergie que je n'en ai dépensé ?" En réalité, tout problème, une fois qu'il est résolu, paraît très simple. La grande victoire, qui aujourd'hui semble facile, est le résultat d'une série de petits succès qui sont passés inaperçus. Alors le guerrier comprend, et il dort tranquille.

Loin de se culpabiliser d'avoir mis si longtemps à arriver là où il voulait, il se réjouit de savoir qu'il est enfin arrivé.

Paulo Coelho (Manuel du Guerrier de la Lumière)

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Remerciements.....	vii
Table des matières.....	xiii
Liste des tableaux.....	xxii
Liste des figures.....	xxiv
Liste des sigles et abréviations.....	xxviii
Avant-propos.....	1
Introduction.....	3
1. Recension de la littérature.....	5
1.1. La réaction inflammatoire causée par un implant.....	5
1.1.1. Généralités.....	5
1.1.2. Réaction inflammatoire aiguë.....	7
1.1.2.1. Phénomènes vasculaires.....	7
1.1.2.2. Phénomènes cellulaires.....	7
1.1.2.2.1. Margination.....	8
1.1.2.2.2. Roulement.....	8
1.1.2.2.3. Adhérence.....	8
1.1.2.2.4. Diapédèse.....	8
1.1.2.2.5. Chimiotactisme.....	9
1.1.2.2.6. Phagocytose et libération des produits leucocytaires.....	10
1.1.2.2.7. Médiateurs chimiques.....	11
1.1.3. Réaction inflammatoire chronique.....	14
1.1.4. Réparation tissulaire.....	16
1.1.4.1. Angiogenèse.....	17
1.1.4.2. Fibrose.....	18
1.1.4.3. Réaction granulomateuse.....	20

1.1.5. Influence de la forme et de la dimension de l'implant.....	21
1.1.5.1. Influence de la forme	21
1.1.5.2. Influence de la dimension	22
1.1.5.3. Cas des débris d'usure d'une prothèse orthopédique.....	23
1.1.6. Influence de la surface de l'implant.....	24
1.1.6.1. Surface lisse	24
1.1.6.2. Surface rugueuse.....	25
1.1.6.3. Porosité.....	26
1.1.6.4. Guidage de contact cellulaire.....	28
1.1.6.4.1. Introduction sur la réaction topographique.....	28
1.1.6.4.2. Adhésion cellulaire à la surface d'un implant.....	30
1.1.6.4.3. Influence d'un creux de surface.....	31
1.1.6.4.4. Influence d'une protubérance de surface.....	34
1.1.6.4.5. Intérêts thérapeutiques du guidage topographique.....	35
1.1.7. Influence des conditions de l'implantation.....	36
1.2. Le concept de biocompatibilité.....	39
1.2.1. Vous avez dit « biomatériau » ?.....	39
1.2.1.1. Définitions.....	39
1.2.1.2. Catégories de biomatériaux.....	40
1.2.1.2.1. En fonction de la réponse de l'hôte.....	40
1.2.1.2.2. En fonction de l'utilisation.....	41
1.2.1.3. Matériaux de référence.....	41
1.2.2. Biocompatibilité et matériau : est-ce compatible ?.....	43
1.2.2.1. Biocompatibilité d'un point de vue théorique : une notion évolutive.....	43
1.2.2.2. Biocompatibilité d'un point de vue sanguin : hémocompatibilité.....	45
1.2.2.3. Biocompatibilité d'un point de vue réglementaire.....	48
1.2.2.4. Biocompatibilité d'un point de vue éthique.....	50
1.2.2.5. Biocompatibilité d'un point de vue philosophique.....	51

1.2.3. Biocompatibilité et rôle de l'implant	53
1.2.3.1. Implants à rôle mécanique	53
1.2.3.2. Implants à libération contrôlée.....	54
1.2.4. Biocompatibilité et devenir de l'implant.....	59
1.2.4.1. Les interactions à l'interface implant – hôte	59
1.2.4.2. Un implant permanent est-il inerte ?.....	61
1.2.4.3. Implant dégradable.....	62
1.2.4.3.1. Dégradation et érosion	62
1.2.4.3.2. Dégradation – érosion de masse.....	65
1.2.4.3.2.1. Les polymères des acides glycolique et lactique.....	67
1.2.4.3.2.2. Autres polyesters.....	71
1.2.4.3.3. Dégradation – érosion de surface.....	72
1.2.4.3.3.1. Les poly(orthoester)	75
1.2.4.3.3.2. Les polyanhydrides	76
1.2.4.4. Infection de l'implant : un devenir sans avenir.....	77
1.2.5. Biocompatibilité de l'amidon.....	82
1.3. Les implants à libération contrôlée	85
1.3.1. Description	85
1.3.1.1. Historique.....	85
1.3.1.2. Concept	87
1.3.1.3. Avantages.....	88
1.3.1.4. Inconvénients	89
1.3.2. Classification.....	89
1.3.2.1. Avant-propos.....	89
1.3.2.2. Systèmes à libération contrôlée par diffusion	91
1.3.2.2.1. Le système réservoir (à membrane)	91
1.3.2.2.2. Le système matriciel (monolithique)	92
1.3.2.3. Systèmes à libération contrôlée par réaction chimique.....	94

1.3.2.3.1. Le système biodégradable	94
1.3.2.3.2. Le système à chaînes polymères greffées	96
1.3.2.4. Systèmes à libération contrôlée par activation par le solvant	97
1.3.2.4.1. Le système à gonflement.....	97
1.3.2.4.2. Le système à pression osmotique (pompe osmotique).....	98
1.3.2.5. Conclusion	102
1.3.3. Application en antibiothérapie loco-régionale	103
1.3.3.1. Pertinence.....	103
1.3.3.2. L'ostéomyélite : un adversaire redoutable	104
1.3.3.3. Le système non dégradé de référence : le PMMA	106
1.3.3.4. Les systèmes dégradables	109
1.3.3.5. Conclusion	111
1.3.4. L'amidon en libération contrôlée	111
1.3.4.1. Composition	112
1.3.4.2. Utilisation en libération contrôlée.....	112
1.3.4.2.1. Libération in vitro	112
1.3.4.2.2. Libération in vivo.....	113
1.3.4.3. Contramid® : un amidon réticulé à teneur élevée en amylose.....	114
1.3.4.3.1. Définition	114
1.3.4.3.2. Caractérisation moléculaire et physico-chimique	116
1.3.4.3.3. Propriétés physiques et mécaniques de gonflement.....	120
1.3.4.3.4. Propriétés de libération contrôlée.....	123
2. Travaux de thèse	126
2.1. Article 1 : Characterization of subcutaneous Contramid® implantation: host response and delivery of a potent analog of the growth hormone-releasing factor	127
2.1.1. Abstract	127
2.1.2. Keywords	128
2.1.3. Introduction.....	128

2.1.4. Materials and methods	130
2.1.4.1. Preparation of pellets	130
2.1.4.1.1. Mouse pellet	130
2.1.4.1.2. Pig pellet	130
2.1.4.2. Surgical procedure in mice	130
2.1.4.3. Histologic examination	131
2.1.4.4. Implantation in pigs	131
2.1.4.5. Statistical analysis	132
2.1.5. Results	132
2.1.5.1. Host response to Contramid®	132
2.1.5.2. Hex-hGRF delivery in pigs	138
2.1.6. Discussion	140
2.1.7. Conclusions	144
2.1.8. Acknowledgements	145
2.1.9. References	145
2.2. Article 2 : Evaluation of tissue reaction and biodegradation of implanted cross-linked high amylose starch in rats	150
2.2.1. Abstract	150
2.2.2. Keywords	151
2.2.3. Introduction	151
2.2.4. Materials and methods	152
2.2.4.1. Experimental animals	152
2.2.4.2. Implants	153
2.2.4.3. Implantation procedure	153
2.2.4.4. Macroscopic examination	154
2.2.4.5. Histology	154
2.2.5. Results	155
2.2.5.1. Clinical monitoring and macroscopic observations	155

2.2.5.2. Histologic examination	155
2.2.5.2.1. Subcutaneous Contramid® implants	156
2.2.5.2.2. Intramuscular Contramid® implants	164
2.2.6. Discussion	166
2.2.7. Conclusion	170
2.2.8. Acknowledgements	171
2.2.9. References	171
2.3. Article 3 : Characterization of cross-linked high amylose starch matrix implants 1.	
<i>In vitro</i> release of ciprofloxacin	177
2.3.1. Abstract	177
2.3.2. Keywords	178
2.3.3. Introduction	178
2.3.4. Materials and methods	179
2.3.4.1. Materials	179
2.3.4.2. Preparation of implants	179
2.3.4.3. Twenty-four hour dissolution tests	180
2.3.4.3.1. Evaluation of ciprofloxacin release	180
2.3.4.3.2. Evaluation of implant swelling	180
2.3.4.3.3. Evaluation of implant erosion	180
2.3.4.3.4. Evaluation of implant water uptake	181
2.3.4.4. Extended <i>in vitro</i> drug release experiment	181
2.3.4.5. Statistical analysis	181
2.3.5. Results	182
2.3.5.1. Twenty-four hour dissolution tests	182
2.3.5.1.1. Evaluation of ciprofloxacin release	182
2.3.5.1.2. Evaluation of implant swelling	185
2.3.5.1.3. Evaluation of implant erosion	186
2.3.5.1.4. Evaluation of implant water uptake	187

2.3.5.2. Extended drug release	188
2.3.6. Discussion	190
2.3.6.1. Twenty-four hour dissolution tests	190
2.3.6.2. Extended drug release	191
2.3.7. Conclusions	194
2.3.8. Acknowledgements	194
2.3.9. References	194
2.4. Article 4 : Characterization of cross-linked high amylose starch matrix implants 2. <i>In vivo</i> release of ciprofloxacin	199
2.4.1. Abstract	199
2.4.2. Keywords	200
2.4.3. Introduction	200
2.4.4. Materials and methods	201
2.4.4.1. Materials	201
2.4.4.2. Preparation of implants	201
2.4.4.3. Animals	202
2.4.4.4. Surgical procedure	202
2.4.4.5. Statistical analysis	203
2.4.5. Results	204
2.4.5.1. Host response	204
2.4.5.2. Serum ciprofloxacin concentrations	204
2.4.5.3. Muscle ciprofloxacin concentrations	206
2.4.5.4. Bone ciprofloxacin concentrations	207
2.4.5.5. Residual ciprofloxacin in implants	208
2.4.6. Discussion	209
2.4.7. Conclusions	212
2.4.8. Acknowledgements	213
2.4.9. References	213

3. Discussion générale.....	217
3.1. Propriétés de biocompatibilité des implants Contramid®	217
3.1.1. Biocompatibilité chez la souris	217
3.1.1.1. Avant-propos.....	217
3.1.1.2. Observations macroscopiques.....	218
3.1.1.3. Observations microscopiques	219
3.1.2. Biocompatibilité chez le rat	221
3.1.2.1. Observations macroscopiques.....	221
3.1.2.2. Observations microscopiques	222
3.1.2.3. Généralités	225
3.1.3. Biocompatibilité chez le lapin.....	226
3.1.4. Biocompatibilité chez le porc.....	227
3.1.5. Conclusions	227
3.2. Propriétés de libération contrôlée des implants Contramid®	229
3.2.1. Implants d'hexénoyl-trans-3-hGRF chez le porc	229
3.2.2. Implants de ciprofloxacine.....	232
3.2.2.1. Caractérisation <i>in vitro</i>	232
3.2.2.1.1. Tests de dissolution de 24 h	232
3.2.2.1.2. Tests de dissolution prolongée	236
3.2.2.2. Caractérisation <i>in vivo</i> : implantation chez le lapin	239
3.2.2.2.1. Avant-propos.....	239
3.2.2.2.2. Concentrations systémiques.....	240
3.2.2.2.3. Concentrations tissulaires locales	241
3.2.2.2.4. Ciprofloxacine résiduelle dans les implants.....	243
3.2.2.2.5. Conclusion	243
Conclusion	245
Bibliographie.....	247
Accord et permission des coauteurs de l'article 1.....	I

Accord et permission des coauteurs de l'article 2.....	II
Accord et permission des coauteurs de l'article 3.....	III
Accord et permission des coauteurs de l'article 4.....	IV
Autorisation de l'éditeur de l'article 1	V
Autorisation de l'éditeur de l'article 2	VII
Autorisation de l'éditeur de l'article 3	VIII
Autorisation de l'éditeur de l'article 4	X

Liste des tableaux

Recension de la littérature :

Tableau I : Médiateurs chimiques d'origine plasmatique impliqués de l'inflammation.	13
Tableau II : Médiateurs chimiques d'origine cellulaire impliqués de l'inflammation.....	13
Tableau III : Critères ISO et FDA pour sélectionner les méthodes des tests biologiques d'un biomatériau.....	49
Tableau IV : Tests de biocompatibilité pour un biomatériau avant utilisation sous forme d'implant à libération contrôlée.....	58

Article 1 :

Table 1 : Description of histologic reaction grade score to subcutaneous implanted Contramid [®] in mice. PMNs = polymorphonuclear cells	134
---	-----

Article 2 :

Table 1 : Histologic reaction grade score to implanted Contramid [®] . 0 = no infiltrate; 1 = minimal infiltrate; 2 = moderate infiltrate; 3 = marked infiltrate. PMN = polymorphonuclear cells; M = macrophages; GC = multinucleated giant cells; L = lymphocytes.	156
---	-----

Article 3 :

Table 1a : f_2 values as a function of matrix in 24-hour dissolution tests with control CLHAS implants as the reference.....	183
Table 1b : f_2 values as a function of CFX loading matrix in 24-hour dissolution tests.	183
Table 2a : Axial swelling (mean \pm S.D., n = 3) of 12 different formulations of CLHAS implants after a 24-hour dissolution test.....	186

Table 2b : Erosion (mean \pm S.D., n = 3) of 12 different formulations of CLHAS implants after a 24-hour dissolution test.....	187
Table 2c : Water uptake (mean \pm S.D., n = 3) of 12 different formulations of CLHAS implants after a 24-hour dissolution test.	188
Article 4 :	
Table 1 : CFX-loaded CLHAS implants (200 mg) administered to rabbits.	203
Table 2 : Residual CFX in recovered CLHAS implants (NM: Not Measured; ND: Not Detected).	209
Discussion générale :	
Tableau I : Description des implants de ciprofloxacine testés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	235

Liste des figures

Recension de la littérature :

Figure 1 : Séquence chronologique des différents événements cellulaires liés à la réaction inflammatoire après implantation d'un biomatériau.	6
Figure 2 : Expression des récepteurs membranaires, cytokines et facteurs de croissance par les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire causée par un implant.	9
Figure 3 : Activités biologiques après activation du système du complément par adsorption de la fraction C3b à la surface d'un biomatériau.	10
Figure 4 : Intervention des cytokines et facteurs de croissance produits par les macrophages activés dans le processus de la réparation tissulaire.....	17
Figure 5 : Réaction topographique d'un fibroblaste en fonction A) du rayon de courbure (indiqué en μm) et B) du changement d'angle (indiqué en degrés) d'une surface.	29
Figure 6 : Description schématique de la répulsion stérique exercée par A) les polymères linéaires (PEO) ou B) les protéines globulaires (albumine) greffés à la surface d'un matériau.....	47
Figure 7 : A) Après implantation d'un biomatériau (disque avec losanges), une interaction physico-chimique se développe à l'interface (cercle gris) avec les tissus adjacents (régions striées) ; B) l'évaluation quantitative de ces interactions (flèches) dépendantes des propriétés des différents compartiments (p_n) permettent de prédire la performance <i>in vivo</i> du biomatériau et par conséquent sa biocompatibilité.	60
Figure 8 : Représentation schématique d'un implant caractérisé par une dégradation – érosion de masse du matériau.	67
Figure 9 : Représentation schématique d'un implant caractérisé par une dégradation – érosion de surface du matériau.....	74
Figure 10 : Formation d'un biofilm par adhérence bactérienne à la surface d'un implant. .	80
Figure 11 : Classification des implants à libération contrôlée, basée sur le mécanisme de libération.	90

Figure 12 : Mécanismes de contrôle de la libération d'un principe actif par 1) diffusion avec le système réservoir (A) et le système matriciel (B), 2) réaction chimique avec le système biodégradable (C) et le système à chaînes polymères greffées (D), 3) activation par le solvant avec le système à gonflement (E et F) et la pompe osmotique (G) et 4) action mécanique extérieure (H).	101
Figure 13 : Représentation schématique de la gélatinisation du Contramid [®] avec le réarrangement structurel de l'amylose en doubles hélices de type B (en bas) à partir des simples hélices de type V (en haut). L'amylopectine (formes arborescentes) se retrouve ainsi pseudoréticulée.....	119
Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire du Contramid [®] après gonflement dans un milieu tampon.	120

Article 1 :

Figure 1 : Subcutaneous tissue. Mouse. Swollen Contramid [®] pellet (P) 3 days after implantation. Note the inflammation associated with the suture (S) (bar = 1 cm). ...	135
Figure 2 : Subcutaneous tissue. Mouse. Microscopic aspect of Contramid [®] pellet at day 7. The pellet (P) is infiltrated by polymorphonuclear cells (PMN) and surrounded by macrophages (M). HPS stain (bar = 100 μ m).	136
Figure 3 : Subcutaneous tissue. Mouse. Presence of PAS positive material at the implantation site (day 180) with fibrovascular septa (FV) and thin peripheral fibrous tissue. PAS stain (bar = 100 μ m).	137
Figure 4 : Subcutaneous tissue. Mouse. PAS positive material localized in spumous cytoplasm of macrophages at day 180. PAS stain (bar = 5 μ m).	138
Figure 5 : Comparative effect on IGF-I secretion of three different Hex-hGRF (15 mg) implant formulations used in 8 pigs per group and one solution injected (10 μ g/kg BID for 5 days) in 6 pigs (* $p < 0.05$). The average of initial IGF-I level is represented by the dotted line (....).	139

Article 2 :

Figure 1 : Micrographs of rat subcutaneous tissue response to Contramid[®] (Hematoxylin Eosin Saffron) : a) seven days after implantation, polymorphonuclears (PMN) arranged in small groups infiltrate the implant whereas macrophages (M) are located around polymer (P) (Original magnification = 40 x); b) fourteen days after implantation, fibrovascular septa (FV) develop within the implant (Original magnification = 40 x); c) one month after implantation, few adipocytes (A) appear (Original magnification = 100 x); d) two months after implantation, the implant site is completely infiltrated by macrophages (M) grouped in pseudo-lobules by fibrovascular septa (FV) (Original magnification = 40 x); e) three months after implantation, macrophages (M) are less numerous whereas the number of adipocytes (A) increases (Original magnification = 40 x); f) four months after implantation, few macrophages (M) remain among adipocytes (A) (Original magnification = 40 x). ... 161

Figure 2 : Micrographs of rat subcutaneous tissue response to Contramid[®] (periodic acid-Schiff) : a) one week after implantation, revealed polymer (P) is mainly extracellular (Original magnification = 100 x); b) three months after implantation, the polymer (P) in decreased amounts is intracellular and adipocytes (A) in clusters are present (Original magnification = 40 x). 162

Figure 3 : Micrographs of rat subcutaneous tissue response to Contramid[®] two months after implantation: a) macrophages are colored brown (immunoperoxidase) and correspond to PAS positive areas (Original magnification = 40 x); b) fibrovascular septa and a loose peripheral fibrous tissue are composed of thin fibers colored with reticulin stain (Original magnification = 100 x). 164

Figure 4 : Micrographs of rat intramuscular tissue response to Contramid[®] (Hematoxylin Eosin Saffron) : a) three days after implantation, some myocytes are degenerating (DM). Polymer (P). Polymorphonuclears (PMN) (Original magnification = 100 x); b) seven days after implantation, regenerating myocytes (RM) are observed. Macrophages (M) (Original magnification = 200 x). 166

Article 3 :

Figure 1 : 24-hour cumulative release of CFX (mean \pm S.D., n = 3) from CLHAS implants containing a) 2.5%, b) 5.0% and c) 7.5% CFX with different excipients (S.D. < 1.2 % is hidden by plots).....	185
Figure 2 : Extended dissolution test with 1%-HVO CLHAS implants containing 2.5, 5.0 and 7.5% CFX (mean \pm S.D., n = 5): a) cumulative and b) daily percent release of CFX.....	190

Article 4 :

Figure 1 : Serum concentrations (mean \pm S.E.) of CFX after implantation of six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants / animal. Significant differences ($P \leq 0.05$) were observed: * 2.5%-CFX group versus 7.5%-CFX group at day 1; ** 2.5%-CFX group versus 15.0 and 20.0%-CFX groups and 7.5%-CFX group versus 20.0%-CFX group at day 5; *** 2.5 and 7.5%-CFX groups versus 15.0 and 20.0%-CFX groups at day 7.....	205
Figure 2 : Muscle concentrations (mean \pm S.E.) of CFX after implantation of six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants / animal (* $P \leq 0.05$ for comparisons between treatment groups at a similar time point). MIC for <i>S. aureus</i> is represented by the dotted line; n = 4 animals / column; NM: Not Measured; ND: Not Detected.	206
Figure 3 : Bone concentrations (mean \pm S.E.) of CFX after implantation of six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants / animal (* $P \leq 0.05$ for comparisons between treatment groups at a similar time point). MIC for <i>S. aureus</i> is represented by the dotted line; n = 4 animals / column; NM: Not Measured; ND: Not Detected.	208

Liste des sigles et abréviations

°C	degré Celsius
µg	microgramme
µm	micromètre
\$ US	dollar américain
Al ₂ O ₃	alumine
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , analyse de variance
AUC	<i>area under the curve</i> , aire sous la courbe
BID	<i>bis in die</i> , deux fois par jour (toutes les 12 heures)
BW	<i>body weight</i> , poids vif
CaHPO ₄	phosphate de calcium dibasique
Ca ₃ (PO ₄) ₂	phosphate de calcium tribasique (β-whitlockite)
CD11a	<i>cluster of differentiation 11a</i> , classe de différenciation 11a
CD18	<i>cluster of differentiation 18</i> , classe de différenciation 18
CFX	ciprofloxacine
CLHAS	<i>cross-linked high amylose starch</i> , amidon réticulé à teneur élevée en amylose
cm	centimètre
CMI	concentration minimale inhibitrice
CPP	carboxyphénoxypropane
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , facteur de croissance épidermique
f_2	facteur de similarité pour comparer deux profils de libération d'un même principe actif au cours d'une dissolution
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , facteur de croissance fibroblastique
g	gramme
GRF	<i>growth hormone – releasing factor</i> , facteur de libération de l'hormone de croissance
GH	<i>growth hormone</i> , hormone de croissance

h	heure
HAP	hydroxyapatite
HCl	forme chlorhydrique d'une molécule (sel acide)
HES	hématoxyline – éosine – safran
Hex-hGRF	hexénoyl-trans-3-hGRF
hGRF	<i>human GRF</i> , GRF humain
HPMC	hydroxypropylméthylcellulose
HPS	hématoxyline – phloxine – safran
HVO	<i>hydrogenated vegetable oil</i> , huile végétale hydrogénée
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> , molécule d'adhésion intercellulaire 1
IGF-I	<i>insulin-like growth factor-I</i> , facteur 1 de croissance insulino-mimétique (somatomédine 1)
IL 1	interleukine 1
IL 6	interleukine 6
IL 8	interleukine 8
IM	intramusculaire
IP	immunoperoxydase
ISO	<i>International Standards Organization</i> , Organisation des Standards Internationaux
J.C.	Jésus Christ
kg	kilogramme
kGy	kilogray
kN	kilonewton
LHRH	<i>luteinizing hormone – releasing hormone</i> , facteur de libération de l'hormone lutéinisante
MIC	<i>minimum inhibition concentration</i> , CMI
mg	milligramme
mL	millilitre
mm	millimètre
n	effectif

NaCl	chlorure de sodium
nm	nanomètre
ORO	<i>oil red-O</i> , huile rouge O
<i>P</i>	probabilité d'obtenir la statistique quand l'hypothèse nulle est vérifiée
PAF	<i>platelet-activating factor</i> , facteur d'activation plaquettaire
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i> , acide périodique-Schiff
PBS	<i>phosphate buffered solution</i> , solution tampon phosphate
PCL	poly(ϵ -caprolactone)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , facteur de croissance dérivé plaquettaire
PEO	<i>polyethylene oxide</i> , poly(oxyde d'éthylène)
PGA	poly(acide glycolique)
pGRF	<i>porcine GRF</i> , GRF porcin
pH	valeur logarithmique de la concentration en ion hydrogène
PLA	poly(acide lactique)
PLGA	poly(acide lactique-co-acide glycolique)
PMMA	<i>polymethylmethacrylate</i> , poly(méthacrylate de méthyle)
PMN	<i>polymorphonuclear leukocyte</i> , leucocyte polymorphonucléaire
POCl ₃	oxychlorure de phosphore
POE	poly(orthoester)
ppm	partie par million
PTFE	poly(tétrafluoroéthylène)
PVA	<i>polyvinylalcohol</i> , poly(alcool vinylique)
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SC	sous-cutané
S.D.	<i>standard deviation</i> , écart type
S.E.	<i>standard error</i> , erreur type
spp.	toute espèce confondue du genre bactérien cité
STMP	<i>sodium trimetaphosphate</i> , trimétaphosphate de sodium
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i> , facteur de croissance transformant β

TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i> , facteur de nécrose tumorale α (cachectine)
UHMWPE	<i>ultra high molecular weight polyethylene</i> , polyéthylène à très haute masse molaire
vs	versus
W ₀	masse de l'implant avant une dissolution
W _{CFX24}	masse de CFX libérée après une dissolution de 24 h
W _{d0}	masse sèche de l'implant avant une dissolution
W _{d24}	masse sèche de l'implant après une dissolution de 24 h
W _{w24}	masse de l'implant gonflé après une dissolution de 24 h

Avant-propos

De nos jours, l'impact financier des biomatériaux est devenu important. Le marché annuel mondial de l'implant orthopédique représente à lui seul plus de 3 milliards de dollars US. Plus de 5 % de la population est concernée par les matériaux utilisés dans la réparation corporelle. Environ un million de prothèses totales de hanche et plus de 250 000 prothèses de genoux sont posées chaque année à travers le monde. Si on considère toutes les autres applications thérapeutiques des biomatériaux qui ne cessent de croître, on peut facilement imaginer la part de marché que peuvent prendre de tels systèmes implantables. Chaque année aux États-Unis, jusqu'à 35 millions d'interventions chirurgicales nécessitent l'utilisation d'un système implantable en tout genre.

Pour les vingt prochaines années, avec l'utilisation croissante de ces biomatériaux, il faudra s'efforcer d'améliorer leur biocompatibilité tout en restant dans un contexte d'économie de marché omniprésente. La solution sera de réévaluer les matériaux existants et de les modifier avec les connaissances actuelles en ingénierie chimique et biologique. Ainsi s'est fait sentir le besoin de maintenir un contact permanent entre les ingénieurs dans les matériaux à la fine pointe de la technologie et les scientifiques et/ou cliniciens en recherche, dans les hôpitaux ou en industrie. En effet, la plupart du temps, les cliniciens ne sont conscients ni de la complexité d'un tel système implantable, ni des caractéristiques des matériaux utilisés pour le fabriquer. La recherche en biomatériaux impliquera de plus en plus un échange de connaissances entre les chimistes, les ingénieurs, les biologistes et les médecins.

Le transfert de la technologie, du laboratoire au monde réel, demande de cibler commercialement des applications cliniques et d'approcher les partenaires industriels. L'application de cette règle primordiale entre l'Université de Montréal et Labopharm, a permis le développement d'un implant à libération contrôlée à partir de la technologie du Contramid[®]. Ainsi, ce développement a été initié au cours de cette thèse de doctorat pour une utilisation d'abord en médecine vétérinaire. La première application de l'implant Contramid[®] a été choisie en antibiothérapie loco-régionale, notamment pour le traitement

de l'ostéomyélite chez les animaux de compagnie. Ayant été personnellement confronté à ce genre d'infection problématique en clinique, je m'étais rendu compte de l'absence de solution thérapeutique satisfaisante. En effet, le vétérinaire est astreint à un traitement lourd et fastidieux non seulement pour lui-même mais aussi pour l'animal et son propriétaire. De surcroît souvent trop onéreux, les chances de succès du traitement traditionnel de l'ostéomyélite restent faibles de nos jours. C'est pourquoi, en prenant connaissance de la technologie du Contramid[®], j'ai pensé qu'elle serait un candidat adéquat au concept de l'antibiothérapie loco-régionale. Cette hypothèse s'est révélée vraie grâce aux expériences entreprises dans ce programme de doctorat. Il ne me reste plus qu'à souhaiter que ce travail permettra d'aboutir à un produit que le chirurgien pourra choisir à l'avenir pour augmenter les chances de traitement de l'ostéomyélite.

Tout en évoluant dans des domaines aussi différents de ceux de la biocompatibilité, de la pharmacie galénique ou encore de la pharmacologie et de la pharmacocinétique, ce projet de recherche m'a permis avant tout de découvrir un nouvel aspect du milieu pharmaceutique qu'est celui du contrôle de la libération d'un médicament, aspect tout aussi important que celui du choix du médicament même pour une thérapie. L'industrie pharmaceutique investit énormément dans la libération contrôlée de principes actifs et si plusieurs concepts judicieux ont pu être mis au point, beaucoup de chemin reste encore à faire dans ce domaine.

Cyril Désévaux, D.M.V.

Introduction

La science des biomatériaux s'est beaucoup développée depuis une trentaine d'années, offrant maintenant des programmes d'études supérieures correspondants dans plusieurs universités. Le premier symposium international des biomatériaux a été inauguré en 1967 alors que la communauté scientifique a fondé une Société pour les Biomatériaux aux États-Unis en 1974 puis une en Europe en 1976.

L'utilisation des biomatériaux ne s'arrête plus à la simple fonction de biomécanique qu'on a bien voulu leur donner initialement. Toutes sortes de matériaux ont été testées comme substituts biologiques sous la forme de prothèses ou de matériaux de comblement pour remplacer une partie manquante mécanique voire fonctionnelle. Si la plupart des systèmes implantés ont d'abord eu des propriétés restauratrices de manière passive et inerte, de nouvelles voies thérapeutiques interactives avec l'hôte sont actuellement explorées grâce à la plus grande connaissance des biomolécules et des mécanismes de développement des cellules, tissus et organes.

Quelle que soit sa fonction, on demande à un biomatériau des critères d'adaptation hors du commun à court et long termes. Effectivement, un biomatériau, sous une quelconque forme fonctionnelle, est enfoui dans les tissus de l'hôte, souvent de façon permanente, et on lui demande de remplir pleinement son rôle sans aucune possibilité d'entretien. Hormis quelques exceptions comme dans le domaine de l'aérospatiale par exemple, on ne requiert à aucun autre système de fonctionner dans de telles conditions. Pour un implant, une telle propriété est appelée biofonctionnalité.

Les systèmes à libération contrôlée de substances actives sont une des applications biomédicales que l'on peut explorer avec un implant. Un tel système doit être à la fois un matériau biocompatible, résorbable ou non, et une matrice biofonctionnelle ayant la capacité de libérer une molécule suivant un mécanisme défini. Dans la majorité des cas

incluant celui de cette thèse, les solutions proposées sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, de natures chimiques différentes. Les deux propriétés biocompatibilité et biofonctionnalité peuvent être établies chacune à part pour un même polymère mais elles doivent être conservées lorsqu'elles sont toutes deux mises à contribution. En effet, ces deux propriétés peuvent interagir entre elles. La réponse de l'hôte sur le polymère biocompatible peut altérer la libération de l'agent que contient ce polymère. De la même manière, le mécanisme de libération peut modifier le polymère biofonctionnel de sorte qu'il ne soit plus toléré par l'hôte.

Récemment classé comme nouvelle monographie en tant qu'excipient de comprimés sous le nom commercial Contramid[®], l'amidon réticulé à teneur élevée en amylose est une technologie appartenant à Labopharm inc. Le Contramid[®] a montré des capacités de libération lente d'une molécule *in vitro*. Ainsi cet amidon modifié est actuellement utilisé pour le développement de formes galéniques permettant la libération contrôlée de médicaments après administration par voie orale chez l'Homme. De nature polysaccharidique et d'origine naturelle, il est tout à fait concevable de croire que le Contramid[®] est biocompatible lorsqu'il est implanté. En effet, l'amidon, notamment sous forme de microsphères, a déjà été testé avec succès par voie parentérale, en démontrant des propriétés de biocompatibilité, de biodégradation et même de libération de principe actif. Ainsi est née l'idée d'utiliser le Contramid[®] sous forme d'implants solides pour permettre la libération prolongée systémique ou locale d'un principe actif dans l'optique d'un traitement spécifique et mieux adapté.

Au cours de ces travaux de doctorat, les deux principaux objectifs sont, après implantation de Contramid[®], d'évaluer la réponse de l'hôte et la libération d'un principe actif, afin de déterminer respectivement la biocompatibilité et la biofonctionnalité du polymère, le tout permettant ainsi de définir la performance *in vivo* de l'implant Contramid[®].

1. Recension de la littérature

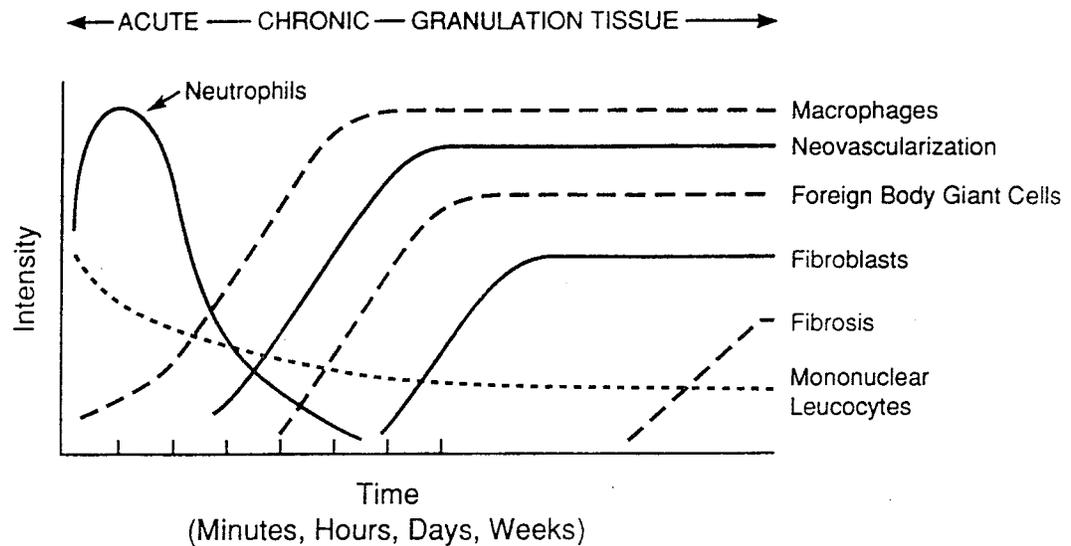
1.1. La réaction inflammatoire causée par un implant

Pour donner une juste évaluation de la réponse de l'hôte envers un implant, il faut d'abord comprendre les étapes de la réaction inflammatoire provoquée par cet implant et/ou son implantation (Coleman et coll., 1974 ; Woodward, 1999).

1.1.1. Généralités

La réponse inflammatoire est intimement liée au processus de guérison. Tout en détruisant ou en isolant l'agent responsable, l'inflammation déclenche une série d'événements entraînant autant que possible une réparation des dommages causés au site d'implantation. Ainsi l'inflammation est fondamentalement une réponse protectrice dont le but ultime est de débarrasser l'organisme de la cause des dommages cellulaires et de ses conséquences (nécrose) (Anderson, 1994a ; Cotran et coll., 1994).

La réaction inflammatoire prend place dans le tissu conjonctif vascularisé (Cotran et coll., 1994). Elle implique le plasma, les leucocytes de la circulation (neutrophiles, monocytes, éosinophiles, lymphocytes, basophiles et thrombocytes), les vaisseaux sanguins, les cellules du tissu conjonctif (fibroblastes, mastocytes, et quelques macrophages et lymphocytes) et la matrice extracellulaire (protéines, glycoprotéines et protéoglycannes) du tissu conjonctif. L'inflammation se divise en phase aiguë et en phase chronique. L'inflammation aiguë est de plus courte durée que l'inflammation chronique. Toutes deux se caractérisent par des phénomènes vasculaires et cellulaires qui sont menés par des facteurs chimiques dérivés du plasma ou des cellules, le tout déclenché par le stimulus inflammatoire (Cotran et coll., 1994). La séquence chronologique des différents événements liés à l'inflammation après une implantation est en général similaire dans les grandes lignes quel que soit le biomatériau (Figure 1). Cependant, la forme, la taille, et les propriétés physico-chimiques de l'implant sont autant de paramètres qui peuvent influencer l'intensité et la durée des différentes étapes de l'inflammation et de la guérison (Anderson, 1994a).



(Anderson, 1994a)

Figure 1 : Séquence chronologique des différents événements cellulaires liés à la réaction inflammatoire après implantation d'un biomatériau.

La réponse de l'hôte à un implant est une version spécialisée de la réaction inflammatoire à un dommage local. Cette inflammation est due à la contribution de l'implant et/ou de l'acte chirurgical qu'est l'implantation. Avant d'utiliser un nouveau biomatériau chez l'Homme, quelle que soit son utilisation, il est obligatoire d'étudier la réaction inflammatoire que son implantation provoque chez des animaux (Woodward, 1999). Il est reconnu que la réaction inflammatoire peut varier selon le tissu ou l'organe concerné (Anderson, 1994a). Cependant l'évaluation de l'inflammation suite à une implantation par voie sous-cutané ou intramusculaire, permet d'anticiper la réponse qu'il induira dans les organes parenchymateux ou autres sites spécialisés (Woodward, 1999). La réponse à l'implant dépend aussi de l'espèce à laquelle appartient l'hôte (Anderson, 1994a). On peut tout de même assumer que généralement l'ampleur et la durée de la réaction inflammatoire provoquée chez le rongeur, le lapin et le chien sont comparables à celles observées chez l'Homme permettant ainsi une bonne prédiction chez ce dernier (Woodward, 1999).

1.1.2. Réaction inflammatoire aiguë

La réponse inflammatoire est d'abord déclenchée par l'acte chirurgical même. Ainsi, dans les premières 24 – 48 heures suivant l'implantation, tout implant est logé dans un champ d'inflammation aiguë (Woodward, 1999).

1.1.2.1. Phénomènes vasculaires

Les phénomènes vasculaires jouent un rôle majeur au cours de cette phase inflammatoire. Premièrement, une vasodilatation locale entraîne une augmentation de l'apport sanguin tout en diminuant son débit au niveau du site d'implantation. Deuxièmement, une augmentation de la perméabilité vasculaire permet aux protéines plasmatiques et aux leucocytes de quitter la circulation sanguine pour s'accumuler au site d'implantation (Anderson, 1994a ; Cotran et coll., 1994 ; Tizard, 1996).

Quatre signes cardinaux de l'inflammation aiguë peuvent être observés à divers degrés au niveau au site d'implantation : rougeur (vasodilatation locale), chaleur (augmentation du flux sanguin local), œdème (augmentation de la perméabilité vasculaire) et douleur (libération et accumulation des médiateurs chimiques de l'inflammation) (Cotran et coll., 1994 ; Tizard, 1996 ; Woodward, 1999).

1.1.2.2. Phénomènes cellulaires

Les phénomènes cellulaires se caractérisent essentiellement par l'accumulation des leucocytes (neutrophiles et monocytes en particulier) au site d'implantation. Ces cellules ont pour rôle d'éliminer l'agent responsable et de débarrasser le site des tissus nécrotiques (Cotran et coll., 1994). Pour arriver à destination, les leucocytes doivent traverser plusieurs étapes (Anderson, 1994a ; Cotran et coll., 1994 ; Tizard, 1996).

1.1.2.2.1. Margination

Avec le ralentissement du débit sanguin dans la microvascularisation des tissus adjacents au site d'implantation, les leucocytes se positionnent en région périphérique, le long de la paroi endothéliale.

1.1.2.2.2. Roulement

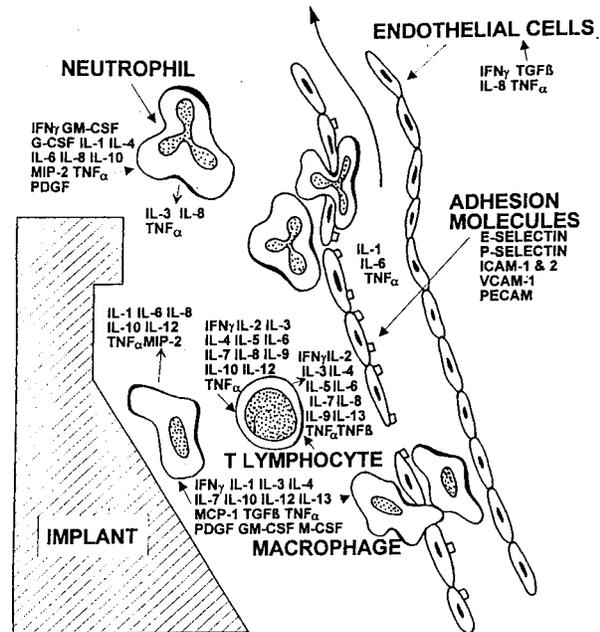
Les leucocytes se mettent à rouler sur les parois vasculaires à la suite d'une adhérence transitoire entre le leucocyte et la cellule endothéliale. Cette dernière, sous l'action de médiateurs inflammatoires, exprime à sa surface des glycoprotéines, les sélectines P puis E qui se fixent aux récepteurs présents à la surface des leucocytes (Figure 2).

1.1.2.2.3. Adhérence

Tout en roulant sur l'endothélium, le leucocyte, activé par des médiateurs inflammatoires (IL-1, TNF- α) et/ou endothéliaux (PAF, IL-8), augmente à sa surface l'expression et l'affinité de ses intégrines (CD11a/CD18) qui se fixent de façon stable avec les molécules d'adhésion (ICAM-1) des cellules endothéliales (Figure 2). Malgré le flux sanguin, le leucocyte est immobilisé et fermement fixé à la paroi vasculaire.

1.1.2.2.4. Diapédèse

Le leucocyte peut commencer sa migration vers le milieu extravasculaire en insérant un pseudopode entre les cellules endothéliales sous l'influence de molécules chimiotactiques (Figure 2). La diapédèse est facilitée par la perméabilité accrue des vaisseaux sanguins.

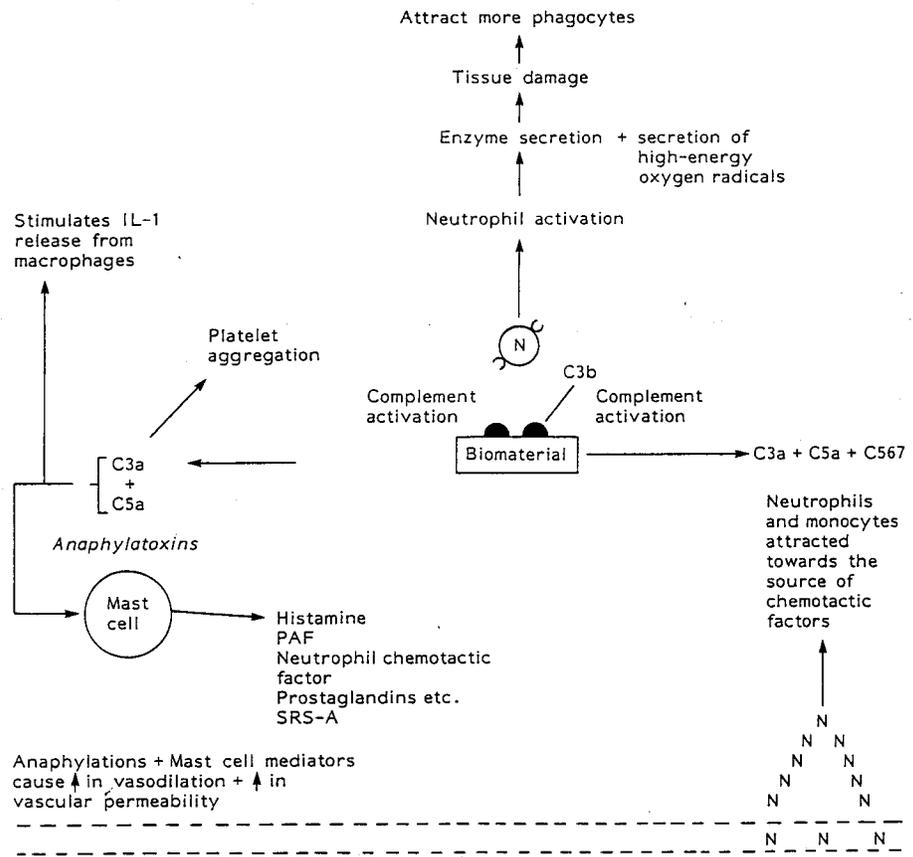


(Hunt et coll., 1997)

Figure 2 : Expression des récepteurs membranaires, cytokines et facteurs de croissance par les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire causée par un implant.

1.1.2.2.5. Chimiotactisme

Les leucocytes sont attirés vers le site d'implantation suivant un gradient de concentration chimique. Plusieurs molécules ont un caractère chimiotactique pour les leucocytes. Parmi les plus importantes, on retrouve 1) les composants du système du complément avec particulièrement C5a (Figure 3), 2) les métabolites de l'acide arachidonique avec notamment le leucotriène B₄ provenant de la voie de la lipooxygénase et 3) les cytokines avec principalement la famille des interleukines dont l'IL-8. En général, dans l'ordre chronologique, les cellules prédominantes dans l'infiltrat inflammatoire sont d'abord les neutrophiles pour les premiers jours puis les macrophages. Les neutrophiles sont les premières cellules à arriver parce que plus mobiles et plus rapides. Les neutrophiles ont une courte durée de vie (24 à 48 h) sur le site d'implantation alors que les macrophages peuvent y survivre de nombreux jours.



(Remes et Williams, 1992)

Figure 3 : Activités biologiques après activation du système du complément par adsorption de la fraction C3b à la surface d'un biomatériau.

1.1.2.2.6. Phagocytose et libération des produits leucocytaires

Une fois localisés sur le site d'implantation, les neutrophiles et macrophages sont activés par plusieurs facteurs chimiques, la plupart étant identiques à ceux responsables du chimiotactisme. À la suite de cette activation, la phagocytose et la libération d'enzymes se produisent.

Le rôle principal des neutrophiles au cours de l'inflammation aiguë est de phagocyter les micro-organismes et corps étrangers. Cependant la majorité des neutrophiles

meurt à ce stade et sont phagocytés par les macrophages. La phagocytose s'effectue en trois étapes : 1) reconnaissance et fixation de la particule à ingérer (débris ou produit de dégradation de l'implant) ; 2) internalisation de la particule par la formation d'une vacuole phagocytaire ; 3) dégradation complète du matériau ingéré dans le phagolysosome. La première étape de la phagocytose peut être amplifiée, tout comme l'activation des leucocytes, lorsque des opsonines (principalement l'immunoglobuline G et la fraction activée du complément C3b) adsorbent la surface de l'implant parce que les neutrophiles et macrophages ont des récepteurs membranaires pour ces opsonines (Figure 3). Par contre, les deuxième et troisième étapes de la phagocytose peuvent ne pas se compléter à cause de la disparité entre la surface de biomatériau à ingérer et la taille des leucocytes. Cette « phagocytose frustrée » a pour conséquence la libération des produits leucocytaires dans le milieu extracellulaire dans le but de dégrader le biomatériau.

Les produits leucocytaires libérés sont essentiellement les enzymes lysosomales présentes dans les granules des neutrophiles, les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ion superoxyde et peroxyde d'hydrogène) et les produits du métabolisme de l'acide arachidonique (prostaglandines et leucotriènes). Ces produits sont de puissants médiateurs des dommages endothéliaux et tissulaires et ils amplifient les effets du stimulus initial de l'inflammation.

1.1.2.2.7. Médiateurs chimiques

Le déroulement de la phase aiguë de l'inflammation dépend de l'action de nombreux médiateurs chimiques (Figure 2). Sans les passer tous en revue, on peut souligner quelques grandes lignes à leur propos. Les médiateurs chimiques ont une origine plasmatique (Tableau I) ou cellulaire (Tableau II). Les médiateurs d'origine plasmatique sont sous forme de précurseurs qui doivent être activés. Les médiateurs d'origine cellulaire sont généralement séquestrés dans les granules intracellulaires. Une fois activés ou libérés, la majorité des médiateurs ont une durée de vie très courte. Un médiateur chimique peut

stimuler la libération d'un autre médiateur à propriétés similaires ou antagonistes, permettant ainsi la régulation de l'inflammation. La plupart de ces médiateurs peuvent avoir des effets néfastes si l'inflammation n'est pas bien contrôlée. Un même médiateur chimique peut agir sur plusieurs types cellulaires et même avoir différents effets en fonction de la cellule cible.

Bien que le système du complément soit l'un des plus anciens médiateurs de l'inflammation décrits, des questions concernant l'activation et le rôle de certaines de ses fractions en présence d'un biomatériau ne sont toujours pas résolues (Remes et Williams, 1992 ; Rihova, 1996 ; Tang et coll., 1998 ; Wetterö et coll., 2002). La cascade du complément est un système qui comprend plus de trente protéines solubles ou liées aux membranes cellulaires. Dans le domaine des biomatériaux, la voie d'activation du complément (classique ou alternative) est encore incertaine (Remes et Williams, 1992 ; Wetterö et coll., 2002). Cependant, la voie alternative semble être la plus plausible avec activation et liaison covalente non spécifique de la fraction C3b à la surface de l'implant (Figure 3) (Tang et coll., 1998). Le système du complément intervient dans l'activation de la réaction inflammatoire par l'adsorption d'autres protéines (Wetterö et coll., 2002) et l'accumulation des cellules inflammatoires (Tang et coll., 1998) à la surface de l'implant. Bien que cette liaison dépende essentiellement de la nature chimique de la surface (Remes et Williams, 1992) comme la présence de groupements hydroxyl OH ou de fonctions amine NH₂ (Tang et coll., 1998), elle est généralement mineure sur une surface artificielle comme celle d'un implant par rapport à une surface biologique (Wetterö et coll., 2002). Toujours est-il que ces phénomènes peuvent altérer la biocompatibilité des biomatériaux destinés à être utilisés en contact direct avec le compartiment sanguin (Remes et Williams, 1992 ; Rihova, 1996 ; Tang et coll., 1998 ; Wetterö et coll., 2002).

Tableau I : Médiateurs chimiques d'origine plasmatique impliqués de l'inflammation.

(Cotran et coll., 1994)

Système	Médiateurs
	C3a
Système du complément	C5a C5b-9
Système des kinines	Bradykinine
Système de la coagulation	Prothrombine / Thrombine Fibrinogène / Fibrine

Tableau II : Médiateurs chimiques d'origine cellulaire impliqués de l'inflammation.

(Cotran et coll., 1994)

	Médiateurs	Origine
Médiateurs Préformés	Histamine	Mastocytes, Thrombocytes
	Sérotonine	Thrombocytes, Mastocytes
	Enzymes lysosomales	Neutrophiles, Macrophages
Médiateurs Synthétisés	Prostaglandines	Leucocytes, Thrombocytes, Endothelium
	Leucotriènes	Leucocytes
	Facteur d'activation plaquettaire	Leucocytes, Endothélium
	Cytokines	Macrophages, Endothélium
	Oxyde nitrique	Macrophages, Endothélium

1.1.3. Réaction inflammatoire chronique

La phase chronique de la réaction inflammatoire est histologiquement moins uniforme que la phase aiguë (Anderson, 1994a). Cette étape apparaît avec la persistance du stimulus inflammatoire, comme par exemple un implant non dégradable ou lentement dégradable. La réaction inflammatoire chronique est caractérisée par une infiltration de cellules mononucléaires (macrophages, lymphocytes et plasmocytes) avec prolifération de vaisseaux sanguins et de tissu conjonctif (Cotran et coll., 1994 ; Anderson, 1994a). Les lymphocytes et les plasmocytes sont impliqués principalement dans les réactions immunitaires à médiation cellulaire ou humorale. Une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire a été observée avec certains biomatériaux (Remes et Williams, 1992). La réponse immunitaire reste encore mal connue mais le rôle du macrophage est certainement important en tant que cellule présentant l'antigène à une cellule immunocompétente (Anderson, 1994a ; Anderson et Langone, 1999). En effet, les macrophages phagocytent les particules de métaux et de céramiques que l'on retrouve ensuite dans les nœuds lymphatiques régionaux (Remes et Williams, 1992). Les implants qui ont des propriétés antigéniques, comme les polymères d'acides aminés, provoquent une réponse inflammatoire où les plasmocytes et lymphocytes prédominent (Woodward, 1999). Une accumulation de plasmocytes a été observée après une seconde implantation sous cutanée de différents biomatériaux chez le rat (Van Luyn et coll., 2001). Ceci peut s'expliquer par l'équivalent d'une réponse mémoire vis-à-vis de protéines autologues qui étaient adsorbées sous forme de complexes à la surface du biomatériau lors de la première implantation. Cependant les lymphocytes peuvent être aussi présents dans une réaction de type non-immunitaire permettant l'activation des macrophages (Cotran et coll., 1994), notamment lorsque l'inflammation chronique perdure avec le développement d'un granulome (Woodward, 1999).

Le macrophage est certainement la cellule la plus représentative de l'inflammation chronique causée par un implant (Anderson, 1994a ; Anderson et Miller, 1984). Les

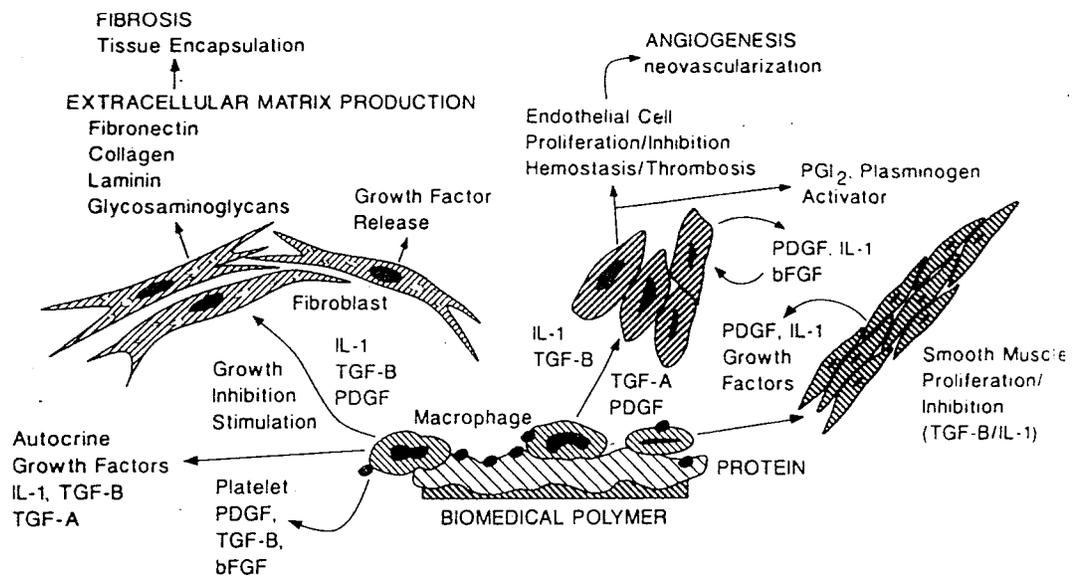
macrophages activés, en préparation ou en cours de phagocytose, sont systématiquement observés à la surface d'un biomatériau implanté (Woodward, 1999). L'espérance de vie d'un macrophage tissulaire est de plusieurs mois (Anderson et Miller, 1984 ; Cotran et coll., 1994). Cette cellule est capable de produire et sécréter une grande variété de substances actives incluant des enzymes (protéases neutres et hydrolases acides), des protéines plasmatiques (constituants du complément et facteurs de coagulation), des métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines et leucotriènes), des cytokines (IL-1, TNF- α , IL-8), des facteurs de croissance (PDGF, EGF, FGF, TGF- β), de l'oxyde nitrique et des métabolites réactifs de l'oxygène (Anderson, 1994a ; Anderson et Miller, 1984 ; Cotran et coll., 1994). Certaines substances sont cytotoxiques (radicaux libres de l'oxygène), d'autres substances sont nocives pour la matrice extracellulaire (protéases), d'autres sont responsables de l'afflux cellulaire (cytokines et facteurs chimiotactiques) et d'autres encore entraînent la fibrose et l'angiogenèse (facteurs de croissance) (Cotran et coll., 1994). Ainsi le macrophage est impliqué dans plusieurs mécanismes qui caractérisent la réaction inflammatoire chronique. Plus robuste, il résiste aux conditions acides provoquées par la dégranulation des neutrophiles (Woodward, 1999). Ainsi, en arrivant sur le site d'implantation, les macrophages activés détruisent et éliminent les cellules nécrotiques (neutrophiles) et les tissus endommagés par phagocytose. Ils libèrent alors des enzymes (collagénases et élastases) pour dégrader directement le tissu conjonctif permettant un « ramollissement » local de la matrice conjonctive (Tizard, 1996). Parallèlement ces cellules entrent en mitose permettant d'assurer dans le temps, une population de macrophages adjacents à l'implant (Woodward, 1999). Enfin les macrophages attirent et activent les fibroblastes pour aider à la réparation tissulaire au site d'implantation. En effet, un des rôles de la réaction inflammatoire est aussi la tentative de guérison du traumatisme provoqué aux tissus (Cotran et coll., 1994).

1.1.4. Réparation tissulaire

En fait, le processus de guérison démarre dès les premières phases de l'inflammation mais il est habituellement complété quand l'agent responsable est considéré comme étant neutralisé d'une manière ou d'une autre par l'hôte (Cotran et coll., 1994). Une implantation est une agression induisant aussi une réponse qui active les mécanismes de guérison. Pendant la phase de réparation d'un site d'implantation, deux phénomènes distincts se produisent : la régénération et la fibrose. Ils sont contrôlés premièrement par la capacité de prolifération cellulaire du tissu ou organe qui reçoit l'implant, et deuxièmement par le réseau tissulaire résiduel au site d'implantation (Anderson, 1994a). Le tissu endommagé est remplacé partiellement par un phénomène de régénération des cellules parenchymateuses. Cependant, même dans les organes où les cellules ont la capacité de se régénérer, la réparation tissulaire s'accomplit aussi par un phénomène de production de tissu conjonctif causé par l'afflux des fibroblastes. Ce phénomène appelé fibrose, donne naissance au tissu cicatriciel. La réparation tissulaire par du tissu conjonctif s'effectue en quatre étapes (Figure 4) (Cotran et coll., 1994) :

- o Formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse)
- o Migration et prolifération des fibroblastes
- o Production de la matrice extracellulaire
- o Maturation et organisation du tissu fibreux (remodelage)

La prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires peut débiter dès le premier jour qui suit l'implantation (Anderson, 1994a). Ce phénomène de prolifération donne naissance à un genre spécialisé de tissu qui est appelé tissu de granulation. Ce tissu, typique de la guérison, peut apparaître dès 3 à 5 jours après l'implantation d'un biomatériau.



(Anderson, 1994a)

Figure 4 : Intervention des cytokines et facteurs de croissance produits par les macrophages activés dans le processus de la réparation tissulaire.

1.1.4.1. Angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de nouveaux petits vaisseaux sanguins, caractéristique du tissu de granulation (Cotran et coll., 1994). Ces nouveaux vaisseaux proviennent du bourgeonnement et de la croissance des vaisseaux capillaires présents aux alentours du site d'implantation (Anderson, 1994a). Le terme de « néovascularisation » s'applique à un implant lorsqu'on observe morphologiquement de nouveaux profils endothéliaux à la surface du polymère. En effet, la prolifération de nouveaux éléments vasculaires peut avoir lieu à la surface voire même à l'intérieur de l'implant quand sa configuration et sa porosité le permettent. Ainsi, quand des disques de poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE) expansé sont implantés dans le tissu adipeux de l'épididyme chez le rat, une importante néovascularisation du tissu avoisinant se développe avec une pénétration des cellules endothéliales dans les interstices du polymère (Williams et coll., 1997). Cette néovascularisation est amplifiée quand le polymère est recouvert

d'une couche de matrice extracellulaire déposée auparavant par une lignée de cellules tumorales (Kidd et coll., 2001b).

Cette néovascularisation est recherchée dans certaines applications. En effet, dans le cas des implants cardio-vasculaires, la capacité d'un biomatériau de promouvoir le développement endothélial à sa surface, est un atout considérable permettant ainsi d'éviter le phénomène de thrombose, complication clinique majeure responsable des échecs d'implantation dans le système circulatoire sanguin (Sanborn et coll., 2002). De la même manière, il est important de considérer la néovascularisation à la surface d'un implant à libération contrôlée de médicaments. Une bonne perfusion des tissus autour d'un tel système permet d'assurer un libre échange entre l'implant et son hôte (Sharkawy et coll., 1998). Cet échange dépend notamment de la densité et de la perméabilité des vaisseaux au sein des tissus avoisinants l'implant.

1.1.4.2. Fibrose

La migration des fibroblastes au site d'implantation suivie de leur prolifération est activée par divers facteurs de croissance et cytokines provenant principalement des macrophages (Figure 4). Plusieurs de ces médiateurs stimulent aussi la synthèse de collagène et autres composantes du tissu conjonctif tout en modulant parallèlement la synthèse et l'activation d'enzymes métalloprotéïnases qui dégradent la matrice extracellulaire (Cotran et coll., 1994). Ainsi le remodelage du tissu conjonctif est caractéristique de la guérison d'une plaie. Parmi les médiateurs impliqués dans la fibrose, le TGF- β est le facteur de croissance le plus critique. Produit par les thrombocytes, macrophages activés et autres cellules, il entraîne la migration et la prolifération des fibroblastes, augmente la synthèse de collagène et de fibronectine, et diminue la dégradation de la matrice extracellulaire causée par les métalloprotéïnases. Le remodelage du tissu conjonctif se caractérise par un dépôt de collagène plus dense et mieux organisé avec une orientation essentiellement parallèle à la surface de l'implant (Von Recum et Van

Kooten, 1995 ; Woodward, 1999). Il se forme ainsi un tissu fibreux capsulaire. La composition chimique d'un biomatériau, la texture de sa surface, la porosité, la forme et la taille sont autant de paramètres qui interviennent dans le degré de fibrose se développant autour, après implantation (Bakker et coll., 1988 ; Li et coll., 1999 ; Von Recum et Van Kooten, 1995). Ainsi une fibrose se développe plus avec certains biomatériaux pouvant aller jusqu'à l'encapsulation et donc l'isolement de l'implant voire même une migration et extrusion de celui-ci (Von Recum et Van Kooten, 1995). Il a même été démontré que le degré de fibrose varie autour d'un même disque d'hydroxyapatite (HAP) implanté en fonction du côté du disque (Li et coll., 1999).

Les conditions de l'implantation, que ce soit la technique adoptée ou le site choisi, sont aussi des paramètres qui influencent le degré de fibrose (Bakker et coll., 1988). Effectivement, en fonction du niveau du traumatisme provoqué au cours de l'implantation avec notamment l'étendue de perte de tissu qui en découle, une guérison par seconde intention se produit pour combler le déficit tissulaire en partie avec du tissu fibreux (Anderson, 1994a). Par ailleurs, il a été rapporté que l'implantation de différents matériaux provoquait une fibrose plus importante dans le muscle qu'à d'autres sites (Bakker et coll., 1988).

Le degré de fibrose autour d'un implant est primordial à appréhender quand il faut considérer le rôle attribué à cet implant. Avec un système à libération contrôlée de médicaments, on cherche à obtenir une fibrose minimale voire même inexistante pour permettre la diffusion d'une molécule de l'implant, d'autant plus si la capsule n'est pas vascularisée. Ce principe est d'autant plus crucial lorsque la diffusion de substances doit aussi se faire dans le sens inverse, de l'hôte vers l'implant, pour le bon fonctionnement du système implanté. En effet, c'est le cas des implants biosenseurs à libération d'insuline régulée par une membrane sensible au taux de glucose (Hickey et coll., 2002 ; Langer, 1990 ; Langer et coll., 1990). La formation d'une capsule fibreuse périphérique retarde le temps de réponse du système et diminue son efficacité parce qu'elle se comporte comme

une barrière au libre échange entre l'implant et son hôte (Park et Park, 1996 ; Sharkawy et coll., 1997). Il peut s'agir d'une barrière de diffusion causée par une capsule densément fibreuse ou d'une barrière de perfusion causée par une capsule avasculaire. En fait, pour des implants dont leur fonction nécessite un libre échange de molécules avec l'hôte, il est préférable d'avoir le développement d'une capsule épaisse mais bien vascularisée (Sharkawy et coll., 1998) plutôt que celui d'une capsule fine, très dense, statique et avasculaire comme celle recherchée pour la biocompatibilité des implants inertes (Woodward, 1999).

1.1.4.3. Réaction granulomateuse

Tous les implants persistants du fait qu'ils soient inertes, très faiblement ou très lentement dégradés, finissent par induire une réaction inflammatoire de type granulomateux (Cotran et coll., 1994 ; Von Recum et Van Kooten, 1995 ; Woodward, 1999). Ce type de réaction est aussi appelé granulome à corps étranger, ou encore tout simplement réaction à corps étranger. Des matériaux comme les fibres de coton, le talc, le béryllium et le zirconium incitent la formation de granulomes (Coleman et coll., 1974 ; Woodward, 1999). Si le biomatériau est immunogène, les lymphocytes sont le type cellulaire prédominant (Tizard, 1996). Cependant on retrouve tout de même des lymphocytes dans un granulome provoqué par un implant non immunogène (Woodward, 1999). De manière plus spécifique, la réaction granulomateuse est caractérisée par la formation de cellules géantes multinucléées, ou cellules géantes à corps étranger (Cotran et coll., 1994 ; Tizard, 1996 ; Woodward, 1999). Ces cellules proviennent d'une activation particulière des macrophages qui prennent une apparence épithélioïde et qui fusionnent entre eux le plus souvent (Coleman et coll., 1974 ; Cotran et coll., 1994 ; Woodward, 1999). Les cellules géantes multinucléées peuvent apparaître dès la première semaine tel que rapporté avec des membranes résorbables en polymère d'acide lactique (Piattelli et coll., 1998). La fonction phagocytaire des cellules géantes est moins développée que celle des macrophages alors que leur faculté de sécréter des enzymes est identique. Les cellules géantes marquent

souvent la délimitation entre l'implant et son hôte (Woodward, 1999). Quand une réaction à corps étranger se développe, elle persiste toute la durée de vie de l'implant chez l'hôte. À long terme, une fibrose, voire une encapsulation, se développe autour de l'implant et de la réaction à corps étranger, tous deux ainsi isolés des tissus environnants (Coleman et coll., 1974 ; Anderson 1994). Cette réponse de l'hôte perdure sans évoluer et le renouvellement des cellules reste faible (Woodward, 1999). Malgré la persistance de ces cellules géantes à corps étranger pendant la durée de vie de l'implant, on ne sait pas si elles restent actives en poursuivant la sécrétion de leur contenu lysosomal ou si elles entrent en quiescence (Anderson, 1994a). Ce genre d'inflammation cesse et se cicatrise par du tissu fibreux aussitôt que l'irritant responsable est éliminé (Woodward, 1999).

1.1.5. Influence de la forme et de la dimension de l'implant

1.1.5.1. Influence de la forme

La forme géométrique d'un implant influence le degré de la réaction inflammatoire (Coleman et coll., 1974). Il est reconnu qu'avec plusieurs types de polymères non résorbables, un implant circulaire comme une sphère ou un cylindre, cause le développement d'une capsule fibreuse plus mince qu'un implant avec des formes anguleuses (Woodward, 1999).

Des particules de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) de forme irrégulière causent une réaction inflammatoire plus marquée par rapport à des particules PMMA sphériques de même taille (Gelb et coll., 1994). Même s'il s'agit de particules inférieures à 20 μm de diamètre, la différence de texture de surface intervient dans la variation de la réponse inflammatoire. Cet aspect est abordé ultérieurement.

Des implants en acier inoxydable administrés dans le muscle de lapins ont provoqué une réaction inflammatoire plus forte sous forme de tige que sous forme de disque (Wood et coll., 1970). Avec les contractions musculaires, les tiges étaient plus traumatisantes que

les disques. Les mouvements d'un implant par rapport aux tissus adjacents produisent une irritation et donc un traumatisme cellulaire (Coleman et coll., 1974).

Il semble que la dureté ou l'élasticité de l'implant a une incidence sur la réponse de l'hôte. Il s'agit surtout de l'élasticité relative du biomatériau. Il a été observé que la différence de module élastique entre l'implant et le tissu hôte est proportionnelle à l'amplitude de réaction inflammatoire. Le stress causé par le mouvement et le frottement à l'interface provoquent une irritation mécanique des tissus adjacents (Bakker et coll., 1988 ; Wood et coll., 1970). L'élasticité des implants de silicone est peut-être une des raisons de leur problème de biocompatibilité (Von Recum et Van Kooten, 1995).

1.1.5.2. Influence de la dimension

La réaction inflammatoire peut varier en fonction de la taille du polymère implanté. En effet, pour un biomatériau donné, une forme phagocytable (poudre ou particule) provoque une réaction inflammatoire à un degré différent de celle engendrée par une forme non phagocytable (solide compact, film) (Anderson, 1994a). En général, par rapport à un implant de grande taille, un implant de petite taille cause une réponse inflammatoire plus uniforme parce qu'il a moins tendance à bouger et ses mouvements sont moins traumatiques pour les tissus avoisinants (Woodward, 1999). Par ailleurs, des surfaces trop grandes peuvent empêcher l'exécution de la phagocytose et les produits leucocytaires sont alors déversés dans le milieu extracellulaire. Ces produits toxiques libérés peuvent causer des dommages tissulaires supplémentaires et augmenter le degré de la réaction inflammatoire (Tizard, 1996).

La surface absolue externe de l'implant qui dépend directement de sa forme et de sa dimension n'est pas la seule à intervenir. Le rapport surface / volume de l'implant est un autre facteur à considérer. Une grande surface de biomatériau par rapport au volume de l'implant, comme un polymère constitué de mailles ou une matrice poreuse, incite au

développement d'une réaction inflammatoire avec de nombreux macrophages et cellules géantes à corps étranger (Anderson, 1994a).

Le PMMA sous forme d'implant solide induit une réponse modérée de l'hôte avec une réaction inflammatoire caractérisée par une fine capsule fibreuse bien délimitée et quelques cellules géantes (Goodman et coll., 1988). Par contre les petites particules de PMMA en poudre provoquent une réaction inflammatoire deux fois plus sévère. Les particules sont phagocytées par de nombreux macrophages et cellules géantes qui ne réussissent pas à les lyser. D'autres études ont comparé des particules de même forme mais de dimensions différentes. De forme irrégulière ou sphérique, les particules de petite taille ($< 20 \mu\text{m}$) ont déclenché une réaction inflammatoire plus marquée que les grandes particules ($50 - 350 \mu\text{m}$) (Gelb et coll., 1994). De la même manière, les petites particules phagocytées ($0.325 \mu\text{m}$) ont plus activé les macrophages humains *in vitro* que des particules plus grandes (5.5 et $200 \mu\text{m}$) en faisant libérer plus de cytokines par les cellules en question (Gonzalez et coll., 1996).

Il a été observé qu'il existait une taille optimale pour laquelle les particules de polyéthylène à très haute masse molaire (UHMWPE) font augmenter significativement la production de cytokines par des macrophages en culture (Green et coll., 1998). Cette taille correspond à celle adéquate à la phagocytose. De manière similaire, *in vivo*, la réaction inflammatoire avec le UHMWPE était plus marquée autour des petites particules ($11 \mu\text{m}$) phagocytées que des grandes particules ($99 \mu\text{m}$) (Kubo et coll., 1999).

1.1.5.3. Cas des débris d'usure d'une prothèse orthopédique

La complication majeure d'une prothèse orthopédique en arthroplastie, est la laxité aseptique où la prothèse se désolidarise du système squelettique perdant ainsi toute fonction biomécanique. Cet échec est une conséquence directe de l'influence de la taille d'un matériau implanté vis-à-vis de la réaction inflammatoire. À cause de la dégradation de la prothèse, même minime, des débris d'usure de petite taille s'accumulent à la périphérie.

Une pseudo-membrane riche en macrophages et en cellules géantes se développe autour de l'implant orthopédique. En effet, ces particules induisent une réaction inflammatoire chronique exacerbée et de type granulomateux accompagnée d'une ostéolyse tout autour de la prothèse (Catelas et coll., 1998 ; Gelb et coll., 1994 ; Gonzalez et coll., 1996 ; Goodman et coll., 1988 ; Green et coll., 1998 ; Kubo et coll., 1999 ; Shanbhag et coll., 1998). Plus précisément, les macrophages activés phagocytent les débris et libèrent des médiateurs à propriétés ostéolytiques (IL-1, IL-6, TNF- α et prostaglandine E₂) (Gelb et coll., 1994 ; Gonzalez et coll., 1996 ; Goodman et coll., 1988 ; Green et coll., 1998 ; Shanbhag et coll., 1998).

1.1.6. Influence de la surface de l'implant

Les propriétés physico-chimiques de la surface de l'implant, lieu d'interaction avec l'hôte (interface), modifient la réaction inflammatoire. La simple variation de l'aire de contact entre le biomatériau et le tissu hôte modifie le degré de réaction inflammatoire de ce dernier. Par exemple, il a été rapporté qu'après implantation sous-cutanée chez le rat de disques de HAP ayant 1 mm d'épaisseur et 4 mm de diamètre, l'épaisseur du tissu fibreux qui se développe autour est plus grande en regard des deux grandes surfaces que vis-à-vis des bords latéraux à plus petite surface (Li et coll., 1999).

1.1.6.1. Surface lisse

La surface d'un biomatériau n'est jamais complètement lisse au niveau moléculaire à l'exception de certaines surfaces en mica ou de plans de coupe particuliers de matériaux cristallins (Curtis et coll., 1997). On considère que la surface d'un implant est lisse lorsqu'elle ne présente pas d'aspérités à l'échelle de la cellule. Néanmoins, il a été observé que des cellules réagissent à des variations aussi faibles que 70 nm, ce qui approche les dimensions des grosses molécules (Curtis et coll., 1997).

Avec un biomatériau non toxique ayant une surface lisse, la présence de macrophages n'est jamais très manifeste (Woodward, 1999). Les implants plats et à surface lisse comme les prothèses mammaires, induisent une réaction à corps étranger caractérisée par une couche ou deux de macrophages (Anderson, 1994a). Généralement, deux semaines après l'implantation, les macrophages font place aux fibroblastes qui forment une capsule fibreuse dense (Woodward, 1999 ; Sharkawy et coll., 1997). Des implants de poly(alcool vinylique) (PVA) non poreux (surface lisse) ont fait développer en trois mois chez le rat une capsule de tissu fibreux plus dense et moins bien vascularisée par rapport à des implants de PVA poreux (Sharkawy et coll., 1998) diminuant ainsi la diffusion de substances entre l'hôte et l'implant (Sharkawy et coll., 1997). De la même manière, parmi quatre polymères chimiquement différents et implantés chacun à plusieurs sites chez le rat, le biomatériau non poreux avec une surface lisse a toujours été le seul complètement entouré d'un tissu fibreux dense et non vascularisé (Bakker et coll., 1988).

1.1.6.2. Surface rugueuse

Pour les mêmes raisons qu'il n'est pas toujours évident de définir un biomatériau à surface lisse pour une cellule, il n'est pas facile de déterminer si une surface est rugueuse au niveau de la sensibilité cellulaire (Curtis et Wilkinson, 1997). Une surface est qualifiée de rugueuse quand ses irrégularités (creux et crêtes) sont distribués de manière aléatoire (Von Recum et Van Kooten, 1995). Ainsi une surface rugueuse se différencie d'une surface à texture dont les irrégularités sont organisées. D'ordre général, il est reconnu que l'adhésion cellulaire est plus grande sur une surface rugueuse que sur une surface lisse (Curtis et coll., 1990 ; Von Recum et Van Kooten, 1995). Lorsque la surface de l'implant est rugueuse ou irrégulière, les macrophages sont attirés en plus grand nombre (Salthouse, 1984) et restent actifs à l'interface sur une durée indéterminée (Woodward, 1999). On retrouve par la même occasion, plusieurs cellules géantes à la surface de ces implants, comme c'est le cas pour les prothèses vasculaires à base de PTFE expansé (Anderson, 1994a). Le tissu de granulation est aussi plus développé autour de ces implants à surface

rugueuse (Woodward, 1999 ; Sharkawy et coll., 1998). Une forme modifiée de l'inflammation granulomateuse se développe comme phase finale de réaction de l'hôte avec des implants à surface irrégulière ou à multifilaments. En effet, une population hétérogène de grandes cellules multinucléées pouvant contenir une centaine de noyaux, cerne chaque irrégularité de surface du biomatériau et joue le rôle de barrière entre l'implant et son hôte (Woodward, 1999). Une surface rugueuse peut générer aussi une capsule fibreuse plus épaisse mais moins dense qu'une surface lisse (Li et coll., 1999). Par ailleurs, des microsillons dessinés à la surface d'implants sous-cutanés n'ont pas engendré une capsule fibreuse différente en fonction de la profondeur et de la largeur des sillons d'une part et par rapport à une surface lisse d'autre part (Walboomers et coll., 1998 et 2000). Dès que l'implant est couvert d'une épaisse couche de cellules inflammatoires, l'irrégularité de surface est camouflée de sorte que les cellules du tissu conjonctif périphérique ne peuvent plus détecter la différence entre une surface rugueuse et une surface lisse (Walboomers et coll., 2000). Finalement, la guérison avec un implant à surface rugueuse peut se solder avec des cicatrices fibreuses plus grandes après disparition de la couche de cellules inflammatoires généralement plus épaisse (Woodward, 1999).

1.1.6.3. Porosité

Un biomatériau poreux correspond à un type particulier d'implant à surface rugueuse. La porosité intervient principalement sur la néovascularisation qui se développe à la surface et/ou à l'intérieur de l'implant. En effet, la porosité donne une surface plus ou moins hermétique aux éléments cellulaires. Il a été démontré que le développement de microvaisseaux est bien moindre autour des implants de PVA non poreux qu'autour de ceux de PVA poreux (Sharkawy et coll., 1998). Il a aussi été observé qu'il existe une porosité optimale pour obtenir une néovascularisation maximale à la surface d'implants de PTFE expansé (Salzmann et coll., 1997). Le polymère avec une distance internodale de 60 μm , distance architecturale déterminant la porosité du PTFE expansé, permet une meilleure endothélialisation de surface par rapport au PTFE expansé de 30 et 100 μm , que ce soit

dans le tissu sous-cutané ou dans le tissu adipeux. L'implant ne doit être ni trop peu ni trop poreux. Les cellules endothéliales ne peuvent pas migrer dans des pores trop petits. Cependant, si les pores sont trop grands, les macrophages colonisent à leur tour le réseau polymère et inhibent la prolifération endothéliale (Salzmann et coll., 1997). La notion de porosité optimale pour une meilleure néovascularisation a aussi été rapportée avec des implants de PVA (Sharkawy et coll., 1998). Cet optimum (60 μm) correspond à la dimension moyenne des cellules endothéliales qui trouvent alors une trame sur mesure. Le même phénomène a été observé avec des implants de polyuréthane (Mohanty et coll., 1992). Des petits pores de 5 – 10 μm ne permettent qu'une croissance capillaire superficielle avec une faible infiltration de cellules inflammatoires dans les tissus adjacents. De plus grands pores (200 – 300 μm) donnent un accès facile au processus inflammatoire dominé par l'activité des macrophages en plus grand nombre dans les tissus adjacents. Cependant, les macropores peuvent être interconnectés par un réseau secondaire de micropores. Il a été observé que les caractéristiques de ce réseau secondaire modifiaient l'infiltration fibrovasculaire dans les macropores (150 – 300 μm) de polyuréthanes implantés en sous-cutané chez le rat (Van Tienen et coll., 2002). Les micropores avec un diamètre d'au moins 30 μm permettent la croissance d'un tissu conjonctif bien vascularisé alors qu'avec des micropores plus petits (15 – 20 μm), le biomatériau est essentiellement envahi par des macrophages.

La porosité d'un biomatériau modifie aussi la fibrose périphérique. Les implants de PTFE expansé ayant une distance nodale de 30 μm étaient entourés d'une capsule fibreuse plus dense et plus épaisse que ceux de 60 et 100 μm après 5 mois d'implantation chez le rat (Salzmann et coll., 1997). Les implants 30 μm ont des pores trop petits pour laisser entrer les éléments cellulaires et par conséquent la réaction de l'hôte se comporte comme au contact d'une surface lisse. Par contre, la capsule fibreuse était plus fine autour des implants 60 μm par rapport aux implants 100 μm . À cause des pores plus larges, non seulement plusieurs types cellulaires colonisent le biomatériau, mais en plus le dépôt de collagène dans la trame polymère devient possible (Bakker et coll., 1988 ; Sharkawy et

coll., 1998). Avec le PVA, la colonisation des implants poreux par les différentes composantes cellulaires de l'inflammation a permis le développement d'un tissu réactionnel périphérique au bout de trois mois, plus granulomateux et plus vascularisé (Sharkawy et coll., 1998), ayant ainsi un coefficient de diffusion de substances supérieur, par rapport à la capsule entourant la forme non poreuse du même biomatériau (Sharkawy et coll., 1997). En fait, un implant poreux peut être considéré comme un implant à surface rugueuse d'où la similitude dans le caractère de réponse de l'hôte. Cependant, d'un point de vue topographique, une surface poreuse est plutôt considérée comme une surface à texture (Von Recum et Van Kooten, 1995) puisque la distribution des pores suit généralement une organisation qui caractérise le biomatériau. Par contre, malgré la colonisation possible des différents éléments cellulaires, il n'y a pas pour autant d'adhésion du tissu en croissance à la surface du matériau (Von Recum et Van Kooten, 1995).

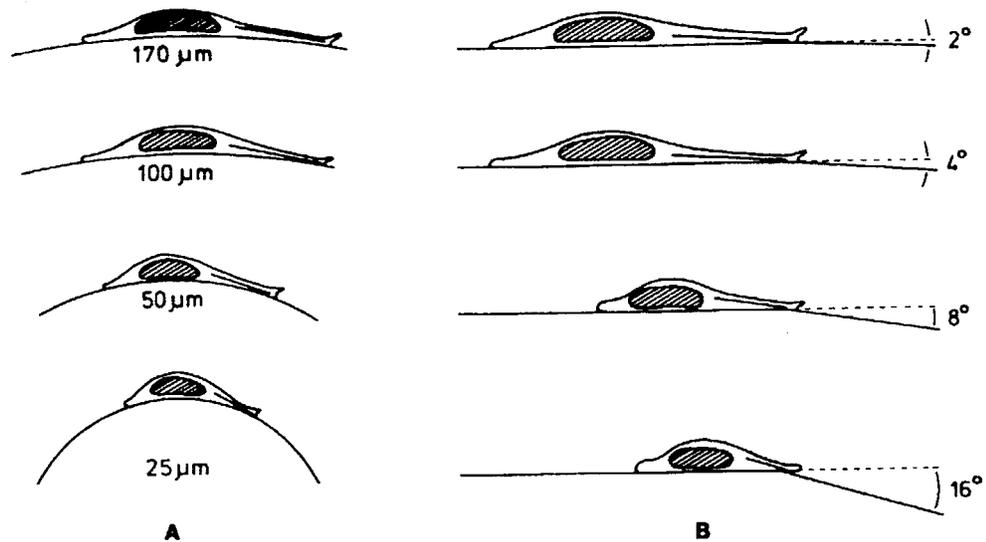
1.1.6.4. Guidage de contact cellulaire

1.1.6.4.1. Introduction sur la réaction topographique

À la différence d'une surface rugueuse, la notion de réaction topographique s'applique dans le contexte de surfaces caractérisées par une texture. Il s'agit de surfaces sur lesquelles ont été façonnées des structures tridimensionnelles (sillons, puits, crêtes, cônes etc...) suivant des caractéristiques physiques (dimensions et distribution) régulières, précises et bien définies (Von Recum et Van Kooten, 1995). Ainsi, en modifiant délibérément les caractéristiques de surface d'un biomatériau, la réaction de l'hôte peut être orientée vers un schéma qui avantage le bon accomplissement du rôle de l'implant. Toutes les cellules vivent au contact d'un substrat qui peut être les autres cellules voisines, la matrice extracellulaire ou un matériau artificiel. Ce substrat qui fait office d'environnement, est caractérisé par une topographie (Curtis et coll., 1990). Cette dernière est définie comme étant la morphologie d'une surface (Von Recum et Van Kooten, 1995). La topographie a des effets directs sur les capacités des cellules à s'orienter, migrer et

arranger un cytosquelette organisé (Flemming et coll., 1999). Ce phénomène est appelé guidage de contact (Curtis et coll., 1990 ; Meyle et coll., 1993 ; Von Recum et Van Kooten, 1995). Ainsi, au contact d'un implant, les cellules ont une réaction topographique qui se traduit par leurs mouvements, leurs formes et leurs orientations. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce guidage de contact (Meyle et coll., 1993) :

- o Influence des forces capillaires provenant de l'orientation moléculaire du substrat (surface de l'implant).
- o Différence d'adhésivité du substrat environnemental (composition chimique du biomatériau).
- o Interaction entre le rayon de courbure de la surface de l'implant et la rigidité du cytosquelette (Figure 5).
- o Possibilité de pontage cellulaire sur la surface de l'implant en fonction de la répartition des points de contact.



(Curtis et Clark, 1990)

Figure 5 : Réaction topographique d'un fibroblaste en fonction A) du rayon de courbure (indiqué en μm) et B) du changement d'angle (indiqué en degrés) d'une surface.

De manière générale, les pseudopodes d'une cellule s'attachent aux discontinuités de surface. Le rayon de courbure et le degré de changement d'angle à la surface définissent l'acuité de la protubérance. Ces paramètres semblent jouer un rôle dans le mécanisme du guidage de contact et modifient le comportement de la cellule (Figure 5). Plus le rayon de courbure est important ou plus l'arête est accrue, plus la cellule limite le contact avec la surface (Curtis et coll., 1990).

1.1.6.4.2. Adhésion cellulaire à la surface d'un implant

À long terme, les implants sont généralement entourés d'une capsule tissulaire non adhérente. Il se crée ainsi un espace mort à l'interface qui permet un mouvement relatif entre l'implant et le tissu avoisinant. Du liquide extracellulaire s'y accumule ainsi que des débris cellulaires, des produits de dégradation du biomatériau et même des bactéries. Cet espace compromet les capacités de vascularisation et de réparation du site d'implantation (Von Recum et Van Kooten, 1995).

Un des facteurs déterminants de l'activité biologique d'une surface artificielle est la capacité de cette surface à adsorber les protéines sériques ou provenant d'ailleurs. Cette adsorption protéique est contrôlée en partie par les propriétés chimiques et la topographie de la surface du matériau (Remes et Williams, 1992). Ainsi la composition chimique d'un biomatériau peut influencer l'adhésion initiale et la répartition des cellules à la surface de l'implant (Meyle et coll., 1993). Alors la question est de savoir si la fabrication d'une topographie produit à la surface de l'implant, un arrangement chimique responsable de la réaction cellulaire (Curtis et coll., 1997). En fait, la composition chimique joue un rôle limité dans le phénomène de réaction topographique. Ce fut démontré par le fait que les cellules ont une réaction similaire face à une même topographie à la surface de biomatériaux chimiquement différents (Curtis et coll., 1997).

L'adhésion cellulaire s'effectue en deux étapes (Von Recum et Van Kooten, 1995). La première étape correspond à une attraction de la cellule vers le substrat, régie par des

forces de Van der Waals et des interactions électrostatiques. Au cours de ce type d'interactions non spécifiques, des protéines à la fois membranaires et sécrétées par les cellules sont adsorbées à la surface de l'implant. L'énergie libre et la charge à la surface du matériau jouent un rôle dans l'adsorption des protéines. La deuxième étape consiste en des liaisons récepteurs – ligands, interactions spécifiques à forte affinité. Les cellules se fixent ainsi à un substrat à l'aide d'adhésions focales qui correspondent à un complexe de protéines intracellulaires, transmembranaires (intégrines) et extracellulaires. Les deux intégrines les plus impliquées dans les interactions cellulaires avec un substrat sont la fibronectine et la vitronectine (Von Recum et Van Kooten, 1995).

De manière générale, les protéines hydrophiles ont moins tendance à être adsorbées que les protéines hydrophobes. Autrement dit, les surfaces hydrophobes accumulent plus de protéines adsorbées que les surfaces hydrophiles (Von Recum et Van Kooten, 1995). Les implants ayant une surface hydrophobe ne sont pas pour autant mieux fixés par les tissus adjacents. Effectivement, l'adsorption des protéines n'est qu'une interaction de faible affinité débutant l'adhésion cellulaire. Ensuite les cellules produisent la fibronectine qui vient remplacer les protéines adsorbées à l'interface pour assurer une fixation plus stable. Or il se trouve que le remplacement des protéines adsorbées par la fibronectine n'est pas possible au contact de surfaces hydrophobes alors que cette étape s'effectue normalement à la surface d'un biomatériau hydrophile (Von Recum et Van Kooten, 1995). Cette tendance a été confirmée par une étude qui a comparé la prolifération des fibroblastes à la surface de 112 polymères d'arylates différents, tous à base de diphénols et diacides alternés (Brocchini et coll., 1998). Il a été observé que la prolifération fibroblastique diminuait de façon linéaire, au fur et à mesure que le polymère avait une surface hydrophobe.

1.1.6.4.3. Influence d'un creux de surface

Une cellule peut avoir une réaction topographique vis-à-vis une simple marche d'escalier à la surface du biomatériau. La réaction dépendra de la hauteur de la marche par rapport à la dimension de la cellule (Curtis et coll., 1990). Plus la marche est haute, moins la cellule sera en mesure de couvrir cette irrégularité de surface. Des marches parallèles ont tendance à aligner les cellules à leur sommet et à leur creux.

Quand une structure cylindrique comme une fibre, est implantée en courbe, les cellules ont plus tendance à s'accumuler du côté concave (creux) que du côté convexe (Curtis et coll., 1990). Des disques de PTFE expansé, légèrement incurvés, ont causé le développement d'une capsule fibreuse plus épaisse sur leur côté concave quand ils étaient implantés en région sous-cutanée chez le rat (Kidd et coll., 2001b).

Les creux les plus fréquemment observés, créés et étudiés à la surface d'un biomatériau sont les sillons (Flemming et coll., 1999). Ces structures sont caractérisées par leur profondeur, leur largeur et leur espacement. Habituellement dans les études, les sillons sont disposés parallèlement, identiques entre eux et à égale distance (Flemming et coll., 1999). De règle générale, les cellules s'alignent et s'allongent dans le grand axe des sillons (Curtis et coll., 1990 ; Von Recum et Van Kooten, 1995) avec une organisation du cytosquelette orientée parallèlement au sillon (Flemming et coll., 1999). Cette organisation cellulaire dépend de la taille des sillons. En effet, des fibroblastes en culture cellulaire ont suivi de manière préférentielle l'orientation de sillons majeurs à la surface du silicone alors que ces mêmes cellules s'alignaient suivant l'orientation différente des petits sillons quand les sillons majeurs n'étaient pas encore présents (Brunette, 1986). L'orientation des cellules semble plus dépendre de l'espacement et de la profondeur des sillons que de leur largeur (Curtis et coll., 1990 ; Curtis et coll., 1997 ; Flemming et coll., 1999 ; Von Recum et Van Kooten, 1995). L'orientation des cellules augmente proportionnellement avec la profondeur des sillons mais diminue avec une largeur croissante (Curtis et coll., 1997 ; Flemming et coll., 1999). Une largeur de sillon inférieure ou égale à celle des cellules oriente mieux cette dernière (Curtis et coll., 1997). Une profondeur minimale des sillons semble

nécessaire quelle que soit la largeur, pour induire une variation de la réaction cellulaire. Par exemple, des microsillons de 0.5 μm de profondeur avec une largeur variant entre 2 et 10 μm à la surface de disques de silicone (diamètre 15 mm x épaisseur 1.45 mm) implantés en région sous-cutanée chez le lapin, n'ont pas modifié l'épaisseur de la capsule fibreuse par rapport à une surface lisse mais ont diminué le nombre de cellules inflammatoires et augmenté celui des vaisseaux sanguins de façon significative (Den Braber et coll., 1997). Des disques de polystyrène (diamètre 18 mm x épaisseur 0.2 mm) implantés en région sous-cutanée chez la chèvre et portant à la surface des microsillons plus profonds (1 μm) avec une largeur de 1 à 10 μm n'ont donné aucune différence quant à l'épaisseur de la couche fibreuse et des cellules inflammatoires et quant au nombre de vaisseaux sanguins néoformés (Walboomers et coll., 1998). Par ailleurs, des microsillons de 2 μm de large avec une profondeur variant entre 0.5 et 6 μm à la surface de cylindres de silicone (diamètre 7 mm x longueur 13 mm) implantés en région sous-cutanée chez le cobaye ont provoqué une réaction inflammatoire caractérisée par des cellules phagocytaires présentes en plus grand nombre quand la profondeur du sillon augmentait (Walboomers et coll., 2000).

D'autres paramètres concernant les sillons peuvent intervenir comme par exemple des sillons en courbe versus en ligne droite ou encore des sillons avec des bords à angles différents (Curtis et coll., 1990) suivant que la coupe transversale du sillon soit en forme de U ou de V (Flemming et coll., 1999).

La réaction topographique change aussi d'un type cellulaire à l'autre, certainement à cause de la variation de l'organisation du cytosquelette (Curtis et coll., 1990). Les fibroblastes sont réputés de bien s'aligner sur des sillons alors que les macrophages semblent moins disciplinés et que les neutrophiles ne le sont pas du tout (Flemming et coll., 1999). La grande capacité des fibroblastes à adhérer et à s'organiser sur les microstructures de surface d'un matériau peut être exploitée avec les prothèses à rôle biomécanique. Les nombreuses interdigitations de ces cellules sur les microstructures de surface de l'implant

permettent un étroit lien avec les tissus avoisinants. Ainsi, la stabilité de l'implant chez l'hôte est accrue en limitant les micro-mouvements qui sont souvent responsables d'une augmentation de la réaction inflammatoire et d'une diminution de la biocompatibilité de l'implant (Meyle et coll., 1993 ; Von Recum et Van Kooten, 1995).

1.1.6.4.4. Influence d'une protubérance de surface

Il existe beaucoup moins d'études concernant le comportement cellulaire face à une protubérance à la surface d'un implant. En fait, quand on considère plusieurs sillons ensemble, les cloisons de séparation correspondent à des protubérances (Flemming et coll., 1999).

On peut attribuer de nombreuses formes à une protubérance de surface d'où peut-être la variété de réactions topographiques d'un même type cellulaire. La marche d'escalier peut être reprise comme exemple puisqu'on peut la décomposer en une crête (angle convexe) suivie d'un creux (angle concave). Une cellule est plus en mesure de couvrir un angle droit concave qu'un angle droit convexe (Von Recum et Van Kooten, 1995). L'alignement des cellules augmente proportionnellement avec la hauteur de la marche (Flemming et coll., 1999).

Des microstructures en forme de petits piliers à la surface d'un implant qui viennent interrompre l'organisation des fibres de collagène, ont permis de réduire l'épaisseur de la capsule fibreuse tout en augmentant la vascularisation périphérique qui par conséquent, se tenait plus proche de l'interface de l'implant (Anderson, 1994a). Ces structures ont aussi permis d'augmenter l'activité métabolique des fibroblastes avec de plus grandes sécrétions de médiateurs favorisant l'adhésion et la propagation cellulaires uniquement à leur sommet (Von Recum et Van Kooten, 1995).

Des disques de PTFE (diamètre 1 cm) implantés en région sous-cutanée chez le rat ont modifié la réaction tissulaire quand la surface de ces disques était formée de micro-

spicules coniques d'une hauteur moyenne de 12 μm (Taylor et coll., 1983). Par rapport au même biomatériau avec une surface lisse, l'adhésion cellulaire est augmentée, un plus grand nombre de macrophages et de cellules géantes à corps étranger est présent et la capsule fibreuse est amincie de 30 %.

Plusieurs études ont été menées avec des protubérances de surface irrégulières et par conséquent difficilement définissables. En général, l'adhésion et la migration cellulaires tout comme la production de matrice extracellulaire augmentent proportionnellement avec la grosseur moyenne des protubérances (Flemming et coll., 1999). On rejoint ici le cas de figure des surfaces rugueuses précédemment abordé.

1.1.6.4.5. Intérêts thérapeutiques du guidage topographique

Bien qu'encore au stade expérimental, la formation de microstructures à la surface d'un biomatériau peut devenir une étape primordiale dans la conception d'un implant. On peut déjà imaginer le potentiel d'un tel implant dans le guidage des cellules endothéliales pour l'angiogenèse ou dans l'orientation des neurones et de leurs axones pour la reconstitution d'un réseau de tissu nerveux (Curtis et Clarke, 1990 ; Curtis et Wilkinson, 1997). Des fibres de carbone ont aussi été développées en fonction du guidage de contact pour la suture et la réparation de ligaments rompus (Curtis et Wilkinson, 1997).

Une meilleure fixation par les tissus de l'hôte d'un biomatériau implanté à long terme permet d'augmenter sa biocompatibilité en évitant la formation d'un espace mort à l'interface avec les complications que cela comporte comme une inflammation de type granulomateux persistante, un isolement puis un rejet de l'implant et même une infection. Cette adhésion est notamment intéressante pour les implants de silicone, les prothèses orthopédiques ou dentaires et les mini-pompes ou les cathéters posés à long terme (Von Recum et Van Kooten, 1995).

Les caractéristiques physico-chimiques de la surface d'un matériau sont importantes à considérer au niveau de l'interaction entre l'implant et les tissus adjacents, parce qu'elles sont avant tout impliquées dans la période aiguë de la réaction inflammatoire, c'est-à-dire au tout début de l'implantation. Par conséquent, ces caractéristiques de surface sont critiques dans l'initiation de la biocompatibilité d'un implant (Tesk, 2001).

1.1.7. Influence des conditions de l'implantation

Une cicatrisation par première intention est conditionnelle notamment à peu ou pas de perte tissulaire pendant l'acte chirurgical. Avec la simple mise en place d'un implant, cette condition est plus ou moins difficile à remplir et généralement, une cicatrisation par seconde intention prend place au site d'implantation (Anderson et Miller, 1984). La réponse inflammatoire et la réparation tissulaire dépendent tout d'abord du degré de traumatisme et de l'étendue de la perte tissulaire provoqués par l'implantation même (Anderson, 1994a). Un implant de grande taille, qui plus est résorbable, aura tendance à accroître le développement du tissu de granulation périphérique (Woodward, 1999). Au cours de la cicatrisation par seconde intention de larges plaies, les cellules parenchymateuses ne pouvant pas reconstituer toute l'architecture originelle, la formation de tissu de granulation devient importante et de grandes plages de fibrose cicatricielle en découlent (Anderson, 1994a).

Le site d'implantation joue aussi un rôle sur la réaction inflammatoire. Chez le rat, il a été démontré qu'autour d'un même biomatériau, le développement de la néovascularisation après implantation dans le tissu adipeux est plus important qu'après implantation dans le tissu conjonctif sous-cutané (Salzmann et coll., 1997 ; Williams et coll., 1997 ; Kidd et coll., 2001b). Inversement, la capsule fibreuse autour de l'implant est plus épaisse en région sous-cutanée que dans le tissu adipeux. Par ailleurs des biomatériaux de nature différente implantés au niveau de l'oreille du rat, ont été fragmentés et dégradés plus rapidement en régions péri-osseuse et péri-musculaire qu'en régions sous-mucosale et

tympanique (Bakker et coll., 1988). Cette étude a démontré que quatre biomatériaux chimiquement et structurellement différents ont provoqué une réaction à corps étranger dont les caractéristiques variaient en premier lieu en fonction du site d'implantation. Il va sans dire qu'il est primordial d'évaluer la performance biologique d'un biomatériau à un site d'implantation dont la réponse tissulaire sera la plus proche possible de celle qui aura lieu lors de l'utilisation clinique de ce matériau. Néanmoins, les premières études de biocompatibilité d'un nouveau biomatériau sont habituellement effectuées en régions sous-cutanée et/ou intramusculaire (Woodward, 1999). La réponse dans ces deux régions est généralement prédictive de celle des autres sites d'implantation. La région sous-cutanée permet d'évaluer l'inflammation alors que la région intramusculaire prédit la nécrose tissulaire dans le système cardiovasculaire et les organes parenchymateux.

L'utilisation croissante de polymères synthétiques ou biologiques pour des applications médicales et pharmaceutiques au cours des dernières décennies, implique de plus en plus la situation où un même patient reçoit au moins deux fois un même biomatériau. L'évolution de la réponse de l'hôte après une deuxième implantation peut poser un problème. Il a été démontré chez le rat, que l'implantation répétitive d'un même biomatériau, biodégradable ou non, augmente la réaction inflammatoire à corps étranger (Van Luyn et coll., 2001). En effet, les plasmocytes étaient présents aux sites de seconde implantation et l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de type II était plus élevée. De plus, pour les biomatériaux biodégradables, l'invasion des macrophages et cellules géantes multinucléées était plus forte. Il faudra donc considérer à l'avenir le facteur de la répétition dans l'utilisation d'implants comme les prothèses orthopédiques, pacemakers, valves cardiaques, prothèses mammaires, systèmes à libération contrôlée de médicaments ou encore les injections de collagène à but cosmétique.

La réaction inflammatoire dépend de l'espèce animale utilisée. Déjà en 1955, l'équipe de Sewell rapportait que la vitesse de résorption de fils de suture de Catgut® en région musculaire, diminuait du rat à la souris et de la souris au chien (Sewell et coll.,

1955). Bien que, de nos jours, les études *in vitro* avec des cultures cellulaires permettent d'obtenir de nombreuses informations sur la biocompatibilité d'un biomatériau, les études *in vivo* restent incontournables à cause de la multiplicité des interactions cellulaires et humorales en jeu dans les étapes de la réaction à un corps étranger et de sa guérison (Anderson, 1994a). L'implantation de disques de PTFE expansé 30 μm chez la souris a entraîné une réaction inflammatoire plus faible que chez le rat, avec beaucoup moins de macrophages activés et une capsule fibreuse légèrement moins épaisse aux sites d'implantation (Kidd et coll., 2001a). Par contre la néovascularisation était identique chez les deux espèces.

En conclusion de ce chapitre, les récents progrès en biologie cellulaire et/ou moléculaire ont permis une compréhension, bien qu'encore préliminaire, des interactions des régulateurs biologiques dans la séquence chronologique de l'inflammation, de la réaction à un corps étranger et de la guérison. Néanmoins, la connaissance croissante de ces différentes étapes de l'inflammation et des origines et rôles des cytokines et facteurs de croissance, nous démontre l'existence d'un gigantesque réseau d'interactions cellulaires et moléculaires qui s'active après une implantation, et dont la compréhension ne fait que commencer. Parallèlement, ces progrès commencent à permettre de développer des matériaux capables de contrôler la réponse de l'hôte. Cette habilité à modifier et orienter la réaction inflammatoire va aussi progresser avec la compréhension des propriétés physico-chimiques et biomécaniques des biomatériaux par rapport aux composantes cellulaires et humorales de l'hôte. Si la notion de biocompatibilité d'un biomatériau, sujet du prochain chapitre, a changé au cours des dernières années, elle évoluera encore beaucoup et de manière irrémédiable dans les années à venir.

1.2. Le concept de biocompatibilité

Après avoir abordé la réaction de l'hôte et ses variantes causées par un implant, on peut mieux apprécier la notion de biocompatibilité d'un système implantable. Cette notion est primordiale parce qu'elle permet d'apporter des réponses au besoin crucial de prévoir les limites de la performance *in vivo* des matériaux destinés à être implantés (Bruck, 1990).

1.2.1. Vous avez dit « biomatériau » ?

1.2.1.1. Définitions

Le terme de « biomatériau » a été redéfini à plusieurs reprises pour s'adapter à l'évolution des types de matériaux utilisés à cet effet (Bruck, 1990 ; Chandra et Rustgi, 1998 ; Duncan, 1990 ; Park et Park, 1996 ; Von Recum et coll., 1999) :

- o En 1982, une première définition a été proposée lors de la *Biomaterials Consensus Conference* : « Toute substance (autre qu'un principe actif) ou combinaison de substances d'origine naturelle ou synthétique, pouvant être utilisée en tout temps, comme système à part entière ou partie de système qui traite, accroît ou remplace un tissu, un organe ou une fonction du corps. »
- o En 1986, lors de la même conférence, une définition complémentaire a été proposée : « Un matériau non viable, utilisé dans un dispositif médical pour interagir avec les milieux biologiques. »

Cependant, ces deux définitions manquent de rigueur en omettant de clarifier deux points importants : la réaction de l'hôte et la durée de service (Bruck, 1990). De plus, la seconde définition ne tient pas compte des matériaux contenant des cellules vivantes (Park et Park, 1996). Par contre, ces matériaux viables peuvent être inclus dans la première définition qui énonce les substances d'origine naturelle.

Une définition plus précise et plus satisfaisante avait été soumise dès 1982 lors de la *National Institutes of Health Consensus Conference* : « Un biomatériau est un matériau d'origine naturelle ou synthétique, utilisé seul ou combiné avec un principe actif, comme partie intégrante d'un dispositif, pour le traitement, l'accroissement ou le remplacement de tissus ou organes, sans causer de dommage aigu ou chronique à son hôte, tout en assurant son efficacité biologique et/ou physique prévue, pendant sa durée de service *in vivo*. »

Cette définition considère surtout deux aspects trop souvent ignorés qui sont les effets indésirables et la durée de service de l'implant (Bruck, 1990). En fait, cette définition concorde mieux avec le sens que l'on attribue actuellement à la biocompatibilité. Enfin, les implants à libération contrôlée sont bien intégrés dans cette description du biomatériau, tant au niveau de la tolérance que du rôle de ces systèmes (Park et Park, 1996).

1.2.1.2. Catégories de biomatériaux

1.2.1.2.1. En fonction de la réponse de l'hôte

En fonction de la réponse de l'hôte, un biomatériau peut être placé dans une des quatre catégories suivantes (Mallapragada et Narasimhan, 1999) :

- o Matériau inerte : absence de réponse (rare) ou réponse très faible de l'hôte
- o Matériau interactif : réponse spécifique (voire orientée) comme une adhésion ou une croissance du tissu adjacent à la surface ou dans l'implant
- o Matériau viable : le matériau contenant des cellules vivantes est traité par l'hôte comme une matrice tissulaire normale
- o « Replant » : il s'agit d'un matériau de tissu natif cultivé *in vitro* à partir des cellules du patient

Les deux premiers types (matériaux non vivants) sont plus utilisés pour les systèmes à libération contrôlée (Mallapragada et Narasimhan, 1999). Les deux derniers types se rapprochent plus en fait des greffes hétérologue et autologue avec une étape intermédiaire

de culture *in vitro* entre la biopsie et l'implantation. Ils trouvent plutôt une application dans la régénération tissulaire.

1.2.1.2.2. *En fonction de l'utilisation*

En fonction de leur rôle à jouer, les biomatériaux sont répartis en quatre catégories (Chandra et Rustgi, 1998) :

- o Remplacement d'un tissu malade ou non fonctionnel : articulations, valves cardiaques, dents et lentilles oculaires
- o Assistance à la réparation d'un tissu : fils de sutures, implants chirurgicaux pour les réductions de fractures et dispositifs de réparation de ligaments et tendons
- o Remplacement complet ou partiel de la fonction d'un organe majeur : hémodialyse (reins), assistance respiratoire (poumons) et cardiaque (cœur), perfusion (foie et/ou reins), libération d'insuline (pancréas)
- o Libération d'un principe actif : libération ciblée à une région localisée (tumeur) ou systémique avec un taux soutenu dans le temps (insuline, contraceptifs)

1.2.1.3. **Matériaux de référence**

La pénurie d'une bonne documentation scientifique sur les standards de caractérisation des biomatériaux de référence, pose un problème pour définir la biocompatibilité (Peppas et Langer, 1994 ; Von Recum et coll., 1999). C'est pourquoi en 2000, la division des polymères du *National Institute of Standards and Technology* (Maryland, États-Unis) a ressenti le besoin de réunir la communauté scientifique œuvrant dans le domaine des biomatériaux pour un atelier sur la pertinence et l'élaboration de bases de données de référence des propriétés des biomatériaux (Tesk, 2001). Il s'agissait avant tout de déterminer les informations nécessaires et pertinentes qui doivent figurer dans ces bases de données pour contribuer à l'évaluation et à l'amélioration des performances des matériaux ou dispositifs implantables actuels et futurs. En effet, le développement de bases de données permettra d'avoir des informations utiles à l'identification et la sélection des

biomatériaux pour les nouveaux systèmes implantables tout en limitant les tests redondants de caractérisation des propriétés. L'intérêt de développer des bases de données et de déterminer des matériaux de référence a été concentré essentiellement dans les domaines orthopédique, ophtalmique, cardio-vasculaire, dentaire et en ingénierie tissulaire (Tesk, 2001) :

- o Les matériaux orthopédiques doivent être classés en fonction de leurs composants, de la réponse biologique (cellulaire et animale) qu'ils provoquent et de leurs propriétés de surface et de masse, de façon à construire une base de données matricielle (structure – composition) x (performance biologique). Parmi les matériaux de référence choisis, on retrouve par ordre de priorité 1) UHMWPE, 2) titane, 3) alliages chrome-cobalt, 4) oxyde d'aluminium, 5) HAP, 6) aciers inoxydables, 7) PMMA et 8) poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA).
- o Un consensus s'est établi sur la nécessité de définir les propriétés des matériaux ophtalmiques pour ériger des standards dans les tests d'étalonnage. La base de données doit présenter les propriétés mécaniques (module élastique, forces de tension et flexion), optiques (indice de réfraction et transparence), chimiques (hydrophobicité, teneur en eau) et biologiques (comportement, interaction, innocuité). Poly(diméthylsiloxane), PMMA et poly(hydroxyéthyl méthacrylate) sont les matériaux de référence.
- o La base de données des matériaux cardio-vasculaires doit contenir des informations sur les propriétés en fonction des applications médicales spécifiques (valves cardiaques, stents endo-vasculaires et autres dispositifs cardio-vasculaires). À cause d'un manque de standardisation des différents tests de caractérisation des propriétés, les seuls matériaux de référence retenus pour le moment sont les polyuréthanes.
- o La base de données des matériaux dentaires doit se construire sur la composition, les propriétés et les performances cliniques. Les matériaux de référence sont entre autres les sulfates et phosphates de calcium et les métaux.
- o Pour les matériaux en ingénierie tissulaire, la base de données doit considérer le type (naturel ou synthétique et résorbable ou irrésorbable) et les caractéristiques physico-chimiques (composition de masse, porosité, vitesse de dégradation, etc.) et mécaniques (module élastique, forces de tension et compression, etc.). Ce nouveau domaine étant en plein essor, les matériaux de référence sont encore à déterminer. Ils doivent être caractérisés de manière spécifiques (porosité, interconnectivité, chimie de surface et de masse, propriétés physiques et mécaniques, réactivité cellulaire).

1.2.2. Biocompatibilité et matériau : est-ce compatible ?

1.2.2.1. Biocompatibilité d'un point de vue théorique : une notion évolutive

Lorsqu'on aborde la question de biocompatibilité d'un biomatériau, il est difficile de la définir sur le plan purement qualitatif (Von Recum et coll., 1999). Alors que des millions de dispositifs médicaux sont implantés chez l'Homme chaque année avec un taux de succès très raisonnable, on pourrait croire que la biocompatibilité est un concept bien assimilé (Ratner, 2002).

Une réponse inflammatoire aiguë de quelques jours est observée avec n'importe quel type d'implant. Tout implant non dégradable va induire chez l'hôte un passage à l'inflammation chronique et même une réponse à un corps étranger à long terme. Dans le contexte de l'implantation, ces réponses doivent être perçues comme étant des réponses locales inévitables (Woodward, 1999). L'étendue et la durée de la réaction inflammatoire caractérisent la biocompatibilité d'un biomatériau. Ainsi, le degré de perturbation des mécanismes homéostatiques et l'étendue des réponses physiopathologiques sont des mesures de la réaction de l'hôte qui peuvent permettre de déterminer la biocompatibilité d'un biomatériau et ses chances d'utilisation en tant qu'implant (Ali et coll., 1993a ; Anderson, 1994a ; Von Recum et coll., 1999).

À partir de l'histopathologie morphologique descriptive de la réaction inflammatoire, la notion de biocompatibilité a évolué vers une énonciation plus globale et tendancieuse du mode d'interaction entre les tissus de l'hôte et le matériau implanté afin de définir si cette interaction permet d'atteindre les attentes prévues en fonction du site et du but de l'implantation (Von Recum et coll., 1999). Ainsi, une définition plus spécifique de la biocompatibilité d'un système implantable a été adoptée par l'ensemble de la communauté scientifique dans le domaine. La biocompatibilité d'un matériau est définie par la capacité

de ce matériau à accomplir un rôle avec une réponse de l'hôte appropriée, dans une application spécifique (Anderson, 1994a ; Chandra et Rustgi, 1998 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999 ; Park et Park, 1996 ; Ratner, 2002 ; Remes et Williams, 1992 ; Von Recum et coll., 1999 ; Zange et Kissel, 1997). Cette définition, bien que précise, ne dit pas comment évaluer la biocompatibilité d'un matériau ni comment l'améliorer (Ratner, 2002). Par contre, cette définition énonce bien que la tolérance de l'hôte est une condition nécessaire mais pas suffisante. Le concept de biofonctionnalité vient s'ajouter puisqu'il faut que l'implant puisse remplir sa fonction. Cette nouvelle conception vient souligner deux intérêts d'étude scientifique (Anderson, 1994a) :

- o L'interaction spécifique d'un matériau qui dirige ou contrôle la réponse inflammatoire à corps étranger de l'hôte.
- o La réaction à corps étranger spécifique à un tissu ou un organe qui mène à des variations de réponses dans des applications particulières.

Ainsi, la réponse de l'hôte va être considérée appropriée en fonction à la fois du type et du rôle du matériau implanté (Park et Park, 1996). En fait, cette conception actuelle de la biocompatibilité qui inclue l'application fonctionnelle de l'implant, est plus restrictive pour un matériau donné. En effet, un matériau qui a fait preuve d'innocuité dans une application spécifique peut ne pas être biocompatible dans une autre application. Il faut alors envisager une nouvelle évaluation de la biocompatibilité avec la nouvelle application. Par contre, un matériau qui provoque une réaction adverse dans une application donnée n'est pas forcément à condamner d'office puisqu'il peut être tout à fait biocompatible dans une autre application (Anderson et Langone, 1999). Dans l'interaction entre l'implant et les tissus adjacents, les caractéristiques physico-chimiques de la surface d'un matériau sont certainement parmi les paramètres les plus critiques à considérer pour comprendre, prévoir et donc orienter la réponse initiale de l'hôte favorablement en fonction du rôle de l'implant, améliorant ainsi sa biocompatibilité. Les propriétés de l'implant dans son ensemble, encore

appelées propriétés de masse (composition intérieure), vont plutôt déterminer le succès de l'implant à long terme (Tesk, 2001).

Pour une évaluation plus globale de la biocompatibilité d'un système implantable, il faut tenir compte non seulement du matériau qui le compose mais aussi des additifs, des résidus et/ou contaminants de fabrication, des produits de dégradation, de l'interaction de toutes les composantes et des caractéristiques du produit fini. Une évaluation du biomatériau isolé ne s'avère pas suffisante pour prévoir la réaction causée par le produit fini après son implantation (Langer et Peppas, 1981 ; Anderson et Langone, 1999).

Finalement, il n'existe pas de définition absolue de la biocompatibilité puisque le monde des biomatériaux est en perpétuelle évolution. Mais d'un point de vue théorique, la réponse de l'hôte recherchée, est toute interaction positive entre le matériau implanté et les tissus avoisinants qui résulte en une participation active des cellules périphériques dans le bon fonctionnement de l'implant. La biocompatibilité correspond à un processus dynamique bidirectionnel qui implique les effets temporels de l'hôte sur le matériau et du matériau sur l'hôte. Lorsque biocompatible, un matériau ne doit pas affecter négativement l'hôte et vice versa (Park et Park, 1996).

1.2.2.2. Biocompatibilité d'un point de vue sanguin : hémocompatibilité

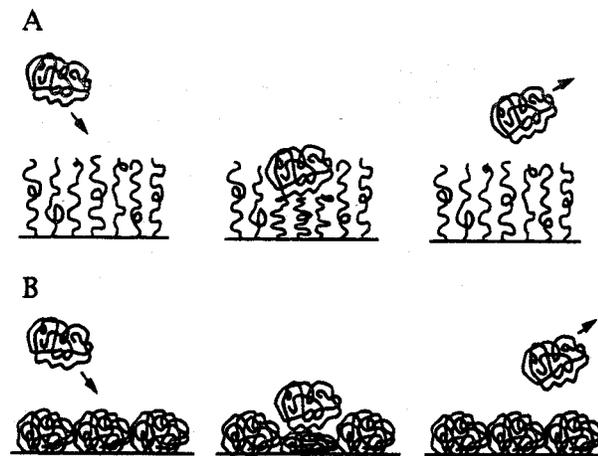
Les dispositifs médicaux cardio-vasculaires sont placés dans le compartiment sanguin. Quand un matériau est exposé au sang, une adsorption des protéines s'effectue très rapidement à sa surface (Bélanger et Marois, 2001 ; Park et Park, 1996). Parmi les protéines adsorbées, le fibrinogène, la fibronectine et les immunoglobulines sont d'une importance capitale pour la biocompatibilité de l'implant puisqu'elles interviennent dans l'adhésion des thrombocytes et des leucocytes à la surface du biomatériau par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques (Bélanger et Marois, 2001 ; Rihova, 1996). En fonction des propriétés physico-chimiques de la surface du matériau, la conformation et l'orientation de ces protéines adsorbées sont des facteurs importants qui contribuent à l'hémocompatibilité

de l'implant à travers l'adhésion et l'activation des thrombocytes (Rihova, 1996). En effet, cette activation entraîne la formation de thrombus à la surface de l'implant, conséquence la plus fréquente et la plus précoce dans l'interaction entre un matériau et le sang. Pratiquement tous les matériaux incluant les polymères, les céramiques et les métaux sont réputés pour induire des thromboses (Park et Park, 1996 ; Ranade, 1990). La formation de thrombus à la surface d'un matériau peut causer plusieurs effets indésirables et parfois même nuisibles à l'hôte. Localement, ces thrombus peuvent provoquer l'occlusion de la greffe vasculaire ou du cathéter et donc du vaisseau sanguin concerné par l'implant (Abraham et coll., 2002 ; Ranade, 1990). Dans le cas d'un système à libération contrôlée, le thrombus peut affecter la cinétique de libération du principe actif (Park et Park, 1996). D'un point de vue systémique, l'embolisation d'un thrombus peut causer des dommages catastrophiques comme un infarctus du myocarde ou une nécrose d'un tissu ou d'un organe par ischémie ou congestion veineuse, au point même de mettre la vie de l'hôte en péril en provoquant un choc vasculaire (Abraham et coll., 2002 ; Orloff et coll., 1997 ; Park et Park, 1996 ; Ranade, 1990). La thrombogénicité devient le critère discriminatoire sur l'hémocompatibilité d'un matériau (Rihova, 1996). L'idéal pour un implant en contact avec le sang, est l'absence totale de la formation de thrombus à sa surface, critère extrêmement difficile à obtenir (Park et Park, 1996).

L'approche la plus souvent considérée pour améliorer l'hémocompatibilité d'un biomatériau, est la modification de sa surface pour diminuer son activité thrombogénique (Abraham et coll., 2002 ; Park et Park, 1996). L'hémocompatibilité de la surface d'un matériau hydrophobe est améliorée grâce à un enrobage ou à une transformation chimique permettant une surface plus hydrophile (Rihova, 1996). En effet, l'adsorption des protéines et l'adhésion des thrombocytes sont généralement amenuisées à la surface d'un matériau quand cette dernière est modifiée avec des groupements ioniques, du poly(oxyde d'éthylène) (PEO), de l'héparine, de l'albumine ou d'autres chaînes polymères hydrophiles (Abraham et coll., 2002 ; Park et Park, 1996). Ces macromolécules hydrophiles flexibles préviennent l'adsorption protéique et l'adhésion cellulaire par un mécanisme de répulsion

stérique en jouant le rôle de « ressorts » à la surface du matériau (Figure 6). Quand ces molécules greffées à la surface sont comprimées par les protéines adsorbées et les thrombocytes, le maximum d'énergie répulsive est atteint dû à l'augmentation de la pression osmotique et des forces élastiques (Park et Park, 1996).

Par ailleurs, des substances ayant une activité anti-plaquettaire comme les prostaglandines, l'héparine, la thrombomoduline, ou même certains anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont été ajoutées à la surface de polyuréthanes, diminuant ainsi son activité thrombogénique (Abraham et coll., 2002). En supplément de leur rôle mécanique initial, certaines prothèses vasculaires font aussi office de systèmes à libération contrôlée (Orloff et coll., 1997).



(Park et Park, 1996)

Figure 6 : Description schématique de la répulsion stérique exercée par A) les polymères linéaires (PEO) ou B) les protéines globulaires (albumine) greffés à la surface d'un matériau.

1.2.2.3. Biocompatibilité d'un point de vue réglementaire

Les critères de l'évaluation de la biocompatibilité ont été établis en 1992 par l'Organisation des Standards Internationaux (ISO) dans un rapport nommé « *International standard on the Biological Evaluation of Medical Devices : ISO 10993* ». En 1995, l'organisme *Office of Device Evaluation in the Center for Devices and Radiological Health* de la *Food and Drug Administration* (FDA) a produit un rapport similaire en adoptant les critères ISO pour accréditer aux États-Unis, l'utilisation chez les humains de nouveaux biomatériaux. Dans les rapports ISO et FDA, ont été identifiés d'une part les catégories de sélection des méthodes pour les tests de réponses biologiques à un biomatériau (Tableau III) et d'autre part, les tests de réponses biologiques (Anderson et Langone, 1999). Ces derniers se divisent en deux catégories :

- o Les tests d'évaluation initiale : cytotoxicité, sensibilisation, irritation cutanée, toxicité systémique, toxicité subaiguë, génotoxicité, implantation, hémocompatibilité.
- o Les tests d'évaluation supplémentaire : toxicité chronique, carcinogénicité, tératogénicité, biodégradation (tests justifiés uniquement par des caractéristiques spécifiques du système implantable).

Il faut être conscient que les résultats obtenus avec ces tests standards dépendent directement de la méthode et du modèle qu'ils imposent, sans être forcément représentatifs pour la prévision de l'innocuité et de l'efficacité d'un matériau donné dans son utilisation ultime (Anderson et Langone, 1999). Les tests *in vitro* sont effectués le plus souvent dans un environnement physiologique et biophysique et plus rarement dans un environnement biologique. Ces tests *in vitro* ne sont pas toujours très concluants à cause de l'absence des mécanismes hémodynamique, hématologique et réticulo-endothélial retrouvés *in vivo* (Mallapragada et Narasimhan, 1999). Ainsi, avant de se voir attribuer le préfixe « bio », un matériau devra passer de nombreux tests *in vitro*, suivis d'études *in vivo* avec plusieurs espèces animales de préférence (Bruck, 1990).

Tableau III : Critères ISO et FDA pour sélectionner les méthodes des tests biologiques d'un biomatériau.

(Anderson et Langone, 1999)

• Dispositifs de surface :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Peau ✓ Muqueuses ✓ Tissus impliqués dans les plaies
• Dispositifs externes reliés au corps :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Compartiment sanguin ✓ Tissus mous ✓ Os
• Implants :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Compartiment sanguin ✓ Tissus mous ✓ Os
• Durée de contact (T) :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ $T \leq 24$ heures → Limitée ✓ $24 \text{ heures} < T \leq 30$ jours → Prolongée ✓ $T > 30$ jours → Permanente

Les polyesters aliphatiques synthétiques dérivés de l'acide glycolique et de l'acide lactique sont les polymères dégradables qui ont une innocuité reconnue. Les organismes réglementaires des différents pays favorisent plus l'utilisation de ces polymères que de ceux nouvellement développés, même si ces derniers sont plus favorables à l'application médicale visée. Par conséquent, les petites compagnies n'ont souvent pas d'autres choix dans leur stratégie de développement, que de se rabattre sur un petit nombre de polymères qui ont déjà été approuvés pour d'autres applications. Ainsi, la rigidité d'un processus d'approbation extrêmement complexe et coûteux limite de manière significative

l'aboutissement au niveau clinique d'une grande variété de nouveaux matériaux prometteurs (Pulapura et Kohn, 1992).

Malgré les nombreuses précautions prises à l'égard de la biocompatibilité des biomatériaux, des effets secondaires sérieux ont été identifiés avec des implants commercialisés comme par exemple les prothèses mammaires remplies de gel de silicone, les implants contraceptifs Norplant[®] ou encore les prothèses en Teflon[®] pour les articulations (Bruck, 1990 ; Park et Park, 1996 ; Ratner, 2002). Cependant il ne faut pas oublier le fait que ces produits ont été lancés sur le marché à une époque où les critères d'évaluation n'étaient pas aussi clairs ou aussi bien standardisés. Avec des critères de réglementation de plus en plus drastiques pour contrôler un matériau, il sera nécessaire de re-évaluer la biocompatibilité des biomatériaux actuellement utilisés (Park et Park, 1996).

1.2.2.4. Biocompatibilité d'un point de vue éthique

La notion de biocompatibilité d'un matériau à l'état pur reste impossible à définir parce qu'il faut toujours considérer la performance *in vivo* qui est recherchée avec ce biomatériau (Ducan, 1990). La biocompatibilité ne peut pas être absolue non plus parce qu'il existe des degrés variables dans les réactions favorables et nuisibles à l'hôte (Von Recum et coll., 1999). La difficulté consiste alors à déterminer de manière précise, les caractéristiques et les paramètres qui décrivent les interactions entre l'implant et l'hôte pour donner les limites de la biocompatibilité. Parce que difficilement discernables, ces limites ont déjà été repoussées récemment par l'incorporation de certaines substances dans des biomatériaux qui améliorent les fonctions de l'implant grâce, en fait, à une meilleure biocompatibilité de ce dernier. Par exemple, la libération locale d'hormone de croissance préalablement incorporée dans l'implant, a permis une meilleure réparation tissulaire et cicatrisation au site d'implantation (Park et Park, 1996). Des microsphères de PLGA contenant un glucocorticoïde ont été développées dans le but de l'associer à un implant biosenseur et d'inhiber les réactions inflammatoires aiguë et chronique locales qui

interfèrent avec le bon fonctionnement du biosenseur (Hickey et coll., 2002). Un polyuréthane commercialisé (Biospan™) pour des dispositifs médicaux en contact avec le sang, a montré de meilleures caractéristiques antithrombogéniques quand était greffé chimiquement à sa surface un anti-inflammatoire non stéroïdien de la famille des salicylés ayant une activité anticoagulante reconnue (Abraham et coll., 2002).

Cependant, l'ajout d'un principe actif pour amenuiser l'inflammation et/ou éviter le rejet de l'implant peut devenir une pratique peu conventionnelle avec les dangers qu'elle comporte. Avec un matériau potentiellement toxique au départ, il s'agit ni plus ni moins de manipulations frauduleuses pour le rendre soit disant biocompatible. On pourrait même parler de « dopage » d'un biomatériau afin qu'il devienne performant. D'un point de vue éthique, les différentes institutions scientifiques de cette discipline devront certainement bientôt se prononcer à propos des limites dans l'autorisation des modifications des biomatériaux destinés à l'implantation. Toutefois, si une déontologie doit prendre place, elle devra relativiser les risques de ce genre de manipulations par rapport aux bénéfices apportés par l'implantation, pour un traitement spécifique. Par exemple, la libération locale d'un agent anti-thrombotique par une prothèse cardiovasculaire afin d'être plus biocompatible, permet d'éviter soit les complications de thrombose si aucun traitement n'est appliqué, soit les risques d'hémorragies d'un traitement systémique pour tolérer cette prothèse, puisqu'elle doit être absolument implantée pour sauver la vie de l'hôte (Orloff et coll., 1997).

1.2.2.5. Biocompatibilité d'un point de vue philosophique

Pendant environ 40 ans, les chercheurs ont suggéré que la biocompatibilité pouvait être reliée à l'énergie de surface, aux charges négatives, aux groupements chimiques, à la rugosité, à la dureté etc. De nos jours, il n'existe toujours pas de règles solidement établies qui permettent de dessiner un matériau pour obtenir une bonne biocompatibilité, preuve que les mystères de la biocompatibilité ne sont pas encore tous élucidés (Ratner, 2002). L'hôte

répond suivant les mêmes étapes pour à peu près tous les matériaux biocompatibles (Anderson, 1994a). Mais cette réponse conduit sous la dénomination de réaction à corps étranger, vers l'internement de l'implant avec une capsule de collagène avasculaire de 50 à 200 μm d'épaisseur. La définition de la biocompatibilité au niveau réglementaire évolue autour de cette réaction de l'hôte qui peut être perçue comme une manière d'isoler le matériau soi-disant biocompatible, équivalant plutôt à un refus de ce matériau (Ratner, 2002). Un organisme vivant a une excellente capacité de guérir les plaies et blessures avec du tissu sain et vascularisé. Alors pourquoi les implants biocompatibles ne permettent-ils pas ce genre de guérison ? Et si la biocompatibilité d'un matériau se définissait par cette guérison ?

Les scientifiques les plus puristes dans le domaine conçoivent la biocompatibilité telle que définie actuellement, comme un idéal intangible et non mesurable que tout matériau essaie d'atteindre sans y parvenir réellement. Il faudrait alors plutôt parler de performance du biomatériau que de biocompatibilité. Mais de la même manière, la performance est matière à interprétation (Von Recum et coll., 1999). Alors que le manque d'une véritable biocompatibilité de quasiment tous les matériaux non-viables est soulevé, vient la question des matériaux viables qui contiennent une partie vivante (cellules) leur permettant ainsi d'être assimilés par l'hôte. Sous la dénomination de biomatériau, est-il approprié de considérer la seule partie synthétique (support) non-viable ou est-il mieux d'envisager le composite « hybride » au complet comme un véritable biomatériau dans lequel une partie améliore les capacités de l'autre ? (Bruck, 1990).

Poussée au plus haut point, il existe une philosophie de pensée qui nous conduit à croire qu'il y a une incompatibilité à vouloir associer biomatériau et biocompatibilité ou que deux routes complètement différentes ont été prises pour établir ces deux concepts.

1.2.3. Biocompatibilité et rôle de l'implant

Le rôle de l'implant a son importance puisque l'évaluation de la performance *in vivo* fait partie intégrante de l'appréciation de la biocompatibilité d'un biomatériau. Les biomatériaux sont essentiellement utilisés pour des applications médicales biomécaniques (prothèses) et/ou thérapeutiques (implants à libération contrôlée). La biofonctionnalité d'un implant va essentiellement dépendre des caractéristiques de la réponse de l'hôte d'une part (Coleman et coll., 1974) et de celle de la dégradation du biomatériau d'autre part (Bakker et coll., 1988). Ainsi les polymères dont la dégradation est relativement rapide seront plus utilisés comme adhésifs, sutures, systèmes à libération contrôlée ou encore comme supports temporaires dans la régénération tissulaire. Au contraire, les métaux sont plus fréquemment utilisés en orthopédie à cause de leur plus grande stabilité dans le temps (Bakker et coll., 1988).

1.2.3.1. Implants à rôle mécanique

La fixation de la surface du biomatériau par les tissus avoisinants peut prendre une importance capitale en fonction du rôle que doit jouer cet implant. La stabilité d'un implant chez l'hôte peut tout simplement définir la biocompatibilité de cet implant (Von Recum et coll., 1995). Une bonne fixation tissulaire qui limite les micro-mouvements d'interface implant-hôte permet de réduire le développement de la réaction inflammatoire chronique et la formation d'une capsule fibreuse, tous deux indésirables parce que souvent responsables de l'échec fonctionnel de l'implant. C'est le cas notamment des prothèses mammaires en silicone, des cœurs artificiels, des pompes à infusion et de la plupart des cathéters posés à long terme. En effet, la capsule fibreuse n'adhère pas à la surface de l'implant, ce qui permet un glissement relatif entre l'implant et le tissu adjacent. Une friction s'ensuit et entraîne l'accumulation de liquide séreux et de cellules inflammatoires à l'interface. La création d'un espace mort entre l'implant et l'hôte est à éviter car plusieurs problèmes

cliniques significatifs peuvent en découler comme par exemple le développement à long terme d'une infection (Von Recum et Van Kooten, 1995).

Pour les prothèses orthopédiques en PMMA et/ou UHMWPE, les débris d'usure à l'interface implant – hôte posent un véritable problème de biocompatibilité à long terme. Les petites particules de matériau issues de la détérioration en surface de la prothèse provoquent une réaction inflammatoire chronique de type granulomateux caractérisée par une pseudo-membrane riche en macrophages et cellules géantes qui sécrètent des médiateurs à propriétés ostéolytiques (Catelas et coll., 1998 ; Gelb et coll., 1994 ; Gonzalez et coll., 1996 ; Goodman et coll., 1988 ; Green et coll., 1998 ; Kubo et coll., 1999 ; Shanbhag et coll., 1998). La complication majeure qui en découle est la laxité aseptique de la prothèse, lui enlevant tout potentiel fonctionnel. Si la réaction inflammatoire causée par les débris d'usure, reste à un degré acceptable pour certains types de systèmes implantables, la prothèse orthopédique est vouée à l'échec dans ce cas de figure. Il est important de considérer la performance *in vivo* d'un dispositif médical dans l'évaluation de sa biocompatibilité.

1.2.3.2. Implants à libération contrôlée

De nombreux matériaux, essentiellement des polymères, ont été étudiés pour la conception de systèmes à libération contrôlée (Orloff et coll., 1997 ; Park et Park, 1996). Parmi ces polymères, on retrouve notamment les polyesters, polyanhydrides, poly(orthoester) (POE), polyamides et plusieurs polysaccharides (Orloff et coll., 1997). Même si l'utilisation est parfois extracorporelle (systèmes transdermiques et oculaires), une implantation est nécessaire pour la plupart des applications médicales de ces systèmes (Langer et Peppas, 1981). Comme pour les autres types d'implants, les conditions de la biocompatibilité s'appliquent aux implants à libération contrôlée et sont souvent la cause de problèmes. Les progrès faits dans la technologie de la libération contrôlée pour les systèmes implantables deviennent futiles s'ils ne sont pas accompagnés de l'amélioration de la

biocompatibilité des matériaux qui les composent (Park et Park, 1996). Cependant, les systèmes à libération contrôlée utilisés pour une implantation à long terme sont relativement rares et quand c'est le cas, il y a souvent des problèmes de performance associés à la biocompatibilité du dispositif (Ratner, 2002).

Les matériaux des implants à libération contrôlée ne doivent pas contenir d'impuretés (solvants) et ni de résidus (monomères) provenant de leur fabrication. Les problèmes de toxicité sont souvent reliés à la libération de ces substances en infimes quantités. Si le matériau doit être dégradable pour une meilleure performance *in vivo*, alors les produits de dégradation doivent faire preuve d'aucune toxicité (Langer et Peppas, 1981).

Dans l'évaluation de la biocompatibilité d'un système à libération contrôlée, il est d'autant plus important de considérer toutes les composantes du produit fini et ses produits de dégradation, qui peuvent modifier la réaction de l'hôte et altérer le bon fonctionnement de l'implant (Langer et Peppas, 1981 ; Anderson et Langone, 1999). Alors que les organismes ISO et FDA demandent une évaluation du produit fini prêt à l'emploi, il peut être avantageux de tester le biomatériau sans la présence du principe actif à libérer. Ce dernier peut en effet, provoquer une réaction inflammatoire amplifiée que l'on attribuerait à tort au matériau (Anderson, 1994b ; Anderson et Langone, 1999). Avant d'être utilisé sous forme d'implant chez l'Homme, un système à libération contrôlée doit passer plusieurs tests pour établir sa biocompatibilité (Tableau IV).

L'orientation que prend la réaction inflammatoire autour d'un implant à libération contrôlée est importante pour sa biocompatibilité en terme de performance biologique. Le développement d'une capsule fibreuse peut retarder et même empêcher la libération d'un principe actif. De la même manière, si l'implant est doté d'un biosenseur pour répondre à certaines conditions du milieu environnant, le temps de réponse sera retardé par la présence d'une capsule fibreuse dense et peu vascularisée qui fait office de barrière anatomique empêchant le contact intime nécessaire entre le tissu adjacent et le dispositif (Hickey et

coll., 2002 ; Langer, 1990 ; Langer et coll., 1990 ; Park et Park, 1996 ; Ratner, 2002 ; Sharkawy et coll., 1997).

Dans la conception d'un implant à libération contrôlée, il faut tenir compte du comportement physique et des propriétés mécaniques du polymère. En effet, l'échec d'un système à libération contrôlée dans les conditions d'implantation, provient souvent d'une faible résistance mécanique par rapport aux forces de l'hôte. Il faut adapter la géométrie de l'implant en fonction de son utilisation. Les propriétés élastiques, le degré de gonflement, la résistance à la tension ou la compression sont autant de paramètres à considérer pour un matériau que l'on veut utiliser dans un système à libération contrôlée implantable (Langer et Peppas, 1981).

Les critères de succès en biocompatibilité pour une implantation à long terme d'un système à libération contrôlée, comprennent en général des cinétiques de libération appropriées (souvent d'ordre zéro), une distribution du médicament dans le compartiment biologique visé par rapport à la libération de l'implant (bonne diffusion), une stabilité de l'implant et du médicament contenu, une taille raisonnable par rapport à l'anatomie du site d'implantation et une stérilisation efficace mais non agressive (Ratner, 2002).

La réaction inflammatoire varie aussi en fonction de la dimension et de la forme de l'implant à libération contrôlée. Après implantation d'un système dégradable, ces paramètres physiques varient au fur et à mesure de la dégradation et la réponse de l'hôte se modifie alors au cours du temps. Ces systèmes à libération contrôlée perdent leur intégrité initiale soit par le mécanisme de libération du principe actif, soit par les modifications physico-chimiques de leur dégradation (Anderson, 1994b). Lors de la dégradation de certains systèmes à libération contrôlée, le principe actif peut être libéré sous une forme complexée avec une partie du polymère. Vis-à-vis de l'hôte, le principe actif devient plus ou moins visible, comme respectivement avec le phosphonate pour cibler le tissu osseux ou le poly(éthylène glycol) pour protéger du système immunitaire. Le complexe peut être alors

considéré comme un nouveau principe actif à part entière faisant ainsi disparaître l'aspect du biomatériau et la notion de biocompatibilité par la même occasion (Bruck, 1990).

L'hydrogel est une forme physique très intéressante pour les matériaux destinés à être utilisés dans les implants à libération contrôlée. Un hydrogel est un réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles réticulés par des liaisons physiques ou chimiques. Plusieurs caractéristiques rendent les hydrogels biocompatibles quand ils sont utilisés sous forme d'implants à libération contrôlée (Park et Park, 1996) :

- o Les hydrogels gonflent dans l'eau ce qui provoque un relâchement du réseau polymère permettant ainsi la libération du principe actif par diffusion. Ce mécanisme de libération peut fonctionner dans la majorité des parties du corps où l'eau est un constituant majeur.
- o Grâce à leur nature hydrophile, les chaînes polymères à la surface qui sont réticulées de façon plus modérée, sont fortement labiles. Cette particularité stimule les propriétés hydrodynamiques des cellules à l'interface de l'implant et prévient ainsi l'adsorption protéique et l'adhésion cellulaire de surface.
- o De la même manière, la nature hydrophile de la surface permet une faible tension à l'interface avec les tissus et les fluides biologiques adjacents, ce qui diminue d'autant plus l'adsorption protéique et l'adhésion cellulaire de surface.
- o Après gonflement, les hydrogels acquièrent une certaine élasticité. Ils peuvent subir des pressions raisonnables des tissus avoisinants sans être déformés tout en continuant à remplir leur rôle.
- o De la même manière, cette élasticité permet de diminuer le risque de traumatiser les tissus avoisinants par irritation, friction et compression, limitant ainsi la fibrose réactive qui compromettrait le fonctionnement de l'implant.

Tout au long de l'évaluation de la biocompatibilité d'un système à libération contrôlée, il ne faut pas perdre de vue qu'un tel système est conçu pour une application bien définie en utilisant un principe actif pour traiter une entité pathologique spécifique. Ces systèmes deviennent ainsi des solutions de choix en thérapie. Les problèmes de réaction de l'hôte associés à l'implantation sont à relativiser par rapport au bénéfice du traitement. Il faut alors savoir faire le choix du moindre mal. Le calcul du risque par rapport au bénéfice

de cette modalité thérapeutique est lié à la morbidité et la mortalité de la maladie pendant le traitement (Anderson et Langone, 1999).

Tableau IV : Tests de biocompatibilité pour un biomatériau avant utilisation sous forme d'implant à libération contrôlée.

(Mallapragada et Narasimhan, 1999)

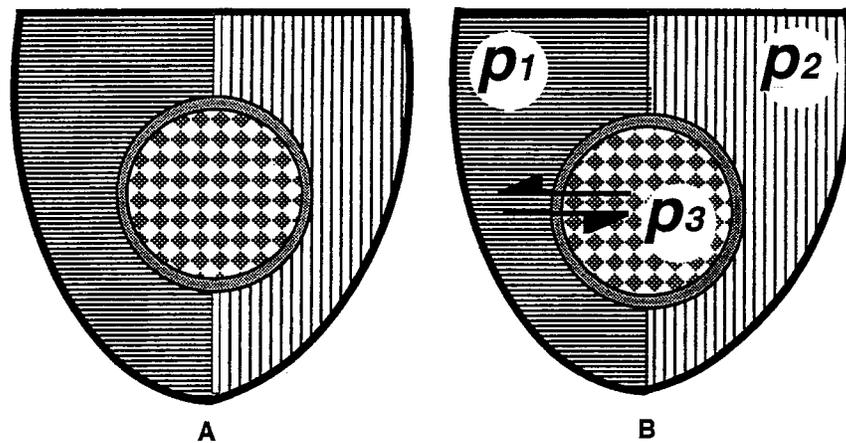
Tests	Environnements biologiques de l'implant		
	Tissus mous et fluides	Tissu osseux	Sang
Cytotoxicité <i>in vitro</i>	X	X	X
Implantation intramusculaire	X		X
Hémocompatibilité			X
Hémolyse			X
Carcinogénicité	X	X	X
Implantation à long terme	X	X	X
Toxicité aiguë (injection systémique)	X	X	X
Injection intracutanée	X		X
Sensibilisation	X	X	X
Mutagénicité	X	X	X
Pyrogénicité	X	X	X

1.2.4. Biocompatibilité et devenir de l'implant

Tout comme l'implantation d'un matériau est considérée comme une agression de la part de l'hôte, la meilleure défense étant l'attaque, la réaction inflammatoire peut aussi être perçue comme une agression sur l'implant. Face à cette attaque de l'environnement biologique dans lequel il est immergé, l'implant peut se comporter de deux manières : être inerte ou presque (implant permanent) ou se dégrader (implant dégradable).

1.2.4.1. Les interactions à l'interface implant – hôte

Le plus grand intérêt des études de biocompatibilité se situe à l'interface entre l'implant et l'hôte, entre un matériau étranger sans vie et des tissus vivants. En effet, le concept de la biocompatibilité doit être abordé en tant que phénomène d'interaction au niveau de cet interface (Figure 7). Il faut tenir compte d'une part de l'effet du matériau sur l'hôte (réaction inflammatoire), et d'autre part de l'action de l'hôte sur le matériau (dégradation). L'implant est inséré dans l'environnement physiologique de l'hôte qui présente des forces capables d'endommager et même de détruire le matériau structural (Von Recum et coll., 1999). Les caractéristiques physico-chimiques de la surface de l'implant sont alors à prendre sérieusement en considération parce qu'elles vont être mises à l'épreuve dans la phase aiguë de l'inflammation et vont être responsables de l'initiation d'une possible biocompatibilité (Tesk, 2001). Le liquide extracellulaire contient d'une part des électrolytes et enzymes qui promeuvent la corrosion, l'abrasion et la dégradation de la surface des matériaux, et d'autre part des protéines et lipides qui adsorbent cette même surface et déclenchent des réactions oxydantes et hydrolytiques sur le matériau. Ces réactions modifient non seulement les caractéristiques de surface, mais aussi les propriétés chimiques et mécaniques de l'ensemble du matériau altérant par conséquent la stabilité (Von Recum et coll., 1999). Interviennent aussi à l'interface, les mouvements de friction entre les tissus et l'implant, qui favorisent une inflammation chronique active (Von Recum et Van Kooten, 1995 ; Von Recum et coll., 1999).



(Von Recum et coll., 1999)

Figure 7 : A) Après implantation d'un biomatériau (disque avec losanges), une interaction physico-chimique se développe à l'interface (cercle gris) avec les tissus adjacents (régions striées) ; B) l'évaluation quantitative de ces interactions (flèches) dépendantes des propriétés des différents compartiments (p_n) permettent de prédire la performance *in vivo* du biomatériau et par conséquent sa biocompatibilité.

La distinction entre un matériau dégradable et un matériau non dégradable est très subtile et devient par conséquent arbitraire (Göpferich, 1996). Tout est une question d'échelle temporelle quand on essaie d'évaluer l'inertie ou la dégradation d'un implant (Bruck, 1990 ; Göpferich, 1996). L'implant permanent n'existe pas dans l'absolu (Bruck, 1990). Ainsi une compétition se crée entre la durabilité du matériau et l'espérance de vie de l'hôte au moment de l'implantation (Bruck, 1990). Effectivement, tout matériau est appelé à se dégrader dans un environnement physiologique (Bruck, 1990 ; Göpferich, 1996). La vitesse de dégradation devient cruciale par rapport à l'état de santé et l'âge de l'hôte, facteurs qui vont eux-mêmes influencer la dégradation. C'est pourquoi, en biocompatibilité, il est primordial de pouvoir évaluer les limites de performance *in vivo* d'un biomatériau (Bruck, 1990). À partir de cette évaluation, la distinction entre un matériau dégradable et un

matériau non dégradable s'établit sur la relation temporelle entre la vitesse de dégradation et la durée d'utilisation (Göpferich, 1996) : Un matériau est considéré dégradable quand il se dégrade pendant son utilisation ou juste après ; un matériau soi-disant non dégradable se dégrade sur une durée substantiellement plus longue que celle de son utilisation.

1.2.4.2. Un implant permanent est-il inerte ?

Au départ, la recherche se limitait à des biomatériaux stables et inertes (Pulapura et Kohn, 1992). Un implant est considéré comme étant inerte lorsqu'il est composé d'un matériau qui ne réagit pas chimiquement face à l'agression enzymatique de la réaction inflammatoire (Woodward, 1999). Cette stabilité chimique était considérée comme une condition nécessaire en matière de biocompatibilité (Pulapura et Kohn, 1992). Cependant, on a eu tendance au départ, à nommer un matériau inerte quand aucune dégradation n'était visible à long terme. Malheureusement, peu de biomatériaux sont réellement inertes car on a pu se rendre compte que plusieurs implants soit disant « inertes » étaient à la source de nombreux irritants chimiques (Coleman et coll., 1974 ; Pulapura et Kohn, 1992). On peut dire que les sutures en nylon monofilament, certains disques de silicone, les tiges orthopédiques en Teflon® et certaines prothèses en acier inoxydable sont actuellement des matériaux inertes lorsqu'ils sont implantés (Pulapura et Kohn, 1992 ; Woodward, 1999).

Des implants métalliques d'apparence inerte subissent en fait une corrosion lente produisant ainsi des ions qui sont responsables d'une irritation et par conséquent d'une perte de biocompatibilité à long terme pouvant expliquer la laxité aseptique observée avec des prothèses orthopédiques métalliques (Coleman et coll., 1974 ; Woodward, 1999). Ces ions métalliques peuvent jouer le rôle d'haptène et se fixer avec une protéine formant ainsi un complexe capable de déclencher une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Remes et Williams, 1992). La libération d'ions métalliques dans les tissus adjacents a été observée avec le cuivre, le cobalt, le chrome et le nickel. Les ions libérés à partir du cuivre stimulent la production des radicaux libres de l'oxygène chez les neutrophiles et la dégranulation de

ces cellules. Les ions de cobalt et de nickel ont plutôt un effet toxique sur les macrophages et les fibroblastes. Dans les deux cas, les enzymes protéolytiques et les radicaux libres, tous deux contenus dans les lysosomes, sont libérés en trop grande quantité par l'activation ou la destruction des phagocytes, et provoquent une nécrose tissulaire locale qui attire encore plus de cellules inflammatoires (Remes et Williams, 1992). De plus, les ions de nickel et de chrome diminuent respectivement la capacité phagocytaire des granulocytes et des macrophages, alors que les ions de cobalt agissent sur les deux types cellulaires. Les ions de cadmium affectent les capacités phagocytaires et bactéricides des macrophages. Les ions de zinc immobilisent les macrophages, et les ions de nickel, les lymphocytes. Tous ces effets des ions métalliques augmentent le risque d'infection au site d'implantation. Ceci expliquerait en partie le taux d'infection élevé de 5 %, un mois après un remplacement total d'articulation avec une prothèse métallique (Remes et Williams, 1992).

Tout comme les métaux, les céramiques non dégradables ou à très lente dégradation ont été considérées comme des biomatériaux inertes. Cependant, il est reconnu que certaines céramiques peuvent activer le système du complément (Remes et Williams, 1992) et/ou induire une attraction et activation des phagocytes (Bosetti et coll., 1999 ; Remes et Williams, 1992). Les poudres de phosphate de calcium (CaHPO_4), de β -whitlockite ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) et de coraux activent le complément, mécanisme par lequel certaines céramiques dégradables sont résorbées. Le CaHPO_4 stimule l'activation des neutrophiles (Remes et Williams, 1992) alors que l'HAP et différentes sortes d'alumines (Al_2O_3) stimulent celle des macrophages (Bosetti et coll., 1999).

1.2.4.3. Implant dégradable

1.2.4.3.1. Dégradation et érosion

Le développement de nouveaux implants biodégradables est un des plus importants domaines de recherche pour les futurs biomatériaux parce qu'ils évitent la nécessité d'une chirurgie supplémentaire pour leur retrait (Ali et coll., 1993a ; Gombotz et Pettit, 1995 ; Langer et Peppas, 1981). De nombreux polymères biodégradables d'origine naturelle ou synthétique, ont été impliqués dans le développement de systèmes à libération contrôlée (Gombotz et Pettit, 1995 ; Göpferich, 1996 ; Orloff et coll., 1997 ; Park et Park, 1996). Les matériaux dégradables sont utilisés dans le traitement local du cancer, le développement de vaccins, la fabrication de nanoparticules, l'autorégulation de systèmes à libération contrôlée, les interventions de réparation orthopédique et le soutien d'un organe défaillant (Göpferich, 1996).

Généralement, la dégradation des matériaux et plus particulièrement celle des polymères, se réalise par la scission des chaînes pour former des oligomères puis des monomères. Le meilleur paramètre pour évaluer la dégradation d'un polymère est donc sa masse molaire (Göpferich, 1996). L'érosion, quant à elle, représente la perte de matériau correspondant au départ des oligomères et monomères du polymère. Le phénomène de l'érosion est plus complexe parce qu'il dépend de plusieurs autres procédés. Le plus important est bien évidemment la dégradation mais il faut aussi considérer le gonflement, la dissolution et la diffusion des oligomères et/ou monomères et les changements structuraux comme ceux de la rugosité de surface, de la porosité et de la cristallinité du polymère (Anderson et Shive, 1997 ; Göpferich, 1996). Les deux principaux mécanismes de dégradation chimique sont l'hydrolyse passive et la réaction enzymatique active. La biodégradation d'un matériau se réfère normalement au second mécanisme, suggérant le fait que la dégradation est menée au moins partiellement par une composante biologique (Göpferich, 1996). Les études *in vitro* peuvent impliquer l'utilisation de différents milieux pseudo-biologiques avec parfois la présence d'enzymes. Cependant, le terme « biodégradation » devrait être réservé à la dégradation *in vivo*, qu'elle soit de type hydrolytique, oxydante ou enzymatique (Bruck, 1990). La dégradation par réaction enzymatique s'applique surtout aux polymères d'origine naturelle tels que les

polysaccharides, protéines (gélatine et collagène) et les poly(β -hydroxyacide) (poly(hydroxybutyrate) et poly(hydroxyvalérate)) (Göpferich, 1996 ; Pulapura et Kohn, 1992). Le plus important mode de dégradation des polymères synthétiques est l'hydrolyse dont la vitesse est essentiellement régulée par la nature des liaisons chimiques dans ces polymères (Gombotz et Pettit, 1995 ; Göpferich, 1996). Les temps de demi-vie des liaisons hydrolysables sont 0.1 heure pour les polyanhydrides, 4 heures pour les POE, 3.3 ans pour les polyesters et 83000 ans pour les polyamides (Göpferich, 1996). Ainsi, des microsphères composées d'un noyau polyanhydride et d'une enveloppe polyester se dégradent *in vitro* et *in vivo* de manière hétérogène (Leach et Mathiowitz, 1998 ; Leach et coll., 1998). Le noyau se dégrade en premier avec la formation d'oligomères et monomères qui restent emprisonnés par l'enveloppe à dégradation plus lente.

D'autres facteurs régulent la dégradation comme le pH et la prise d'eau (Göpferich, 1996). De plus, des changements physico-chimiques du polymère qui se produisent au cours de la dégradation, comme la cristallisation des oligomères et monomères ou la variation du pH, agissent en rétrocontrôle sur cette dégradation (Anderson et Shive, 1997 ; Gombotz et Pettit, 1995 ; Göpferich, 1996). Pour les systèmes à libération contrôlée, la prise d'eau est un paramètre particulièrement important qui, dans le cas des hydrogels, devient plus décisif pour la performance de l'implant que pour la dégradation (Göpferich, 1996 ; Park et Park, 1996). La présence d'une phase cristalline fait diminuer la vitesse de dégradation d'un polymère et cette phase peut augmenter en proportion pendant la dégradation avec la concentration croissante d'oligomères et monomères (Anderson et Shive, 1997 ; Göpferich, 1996 ; Pulapura et Kohn, 1992 ; Li et coll., 1990b et 1990c). Enfin, il faut aussi toujours se soucier du devenir de principes actifs instables (protéines ou peptides) ou de cellules vivantes sensibles quand ils sont impliqués dans un environnement en perpétuelle évolution chimique tel qu'un polymère en érosion (Göpferich, 1996).

La durée d'élimination *in vivo* d'un matériau dégradé est déterminée par la nature des liaisons chimiques du polymère, la solubilité des produits de dégradation, la

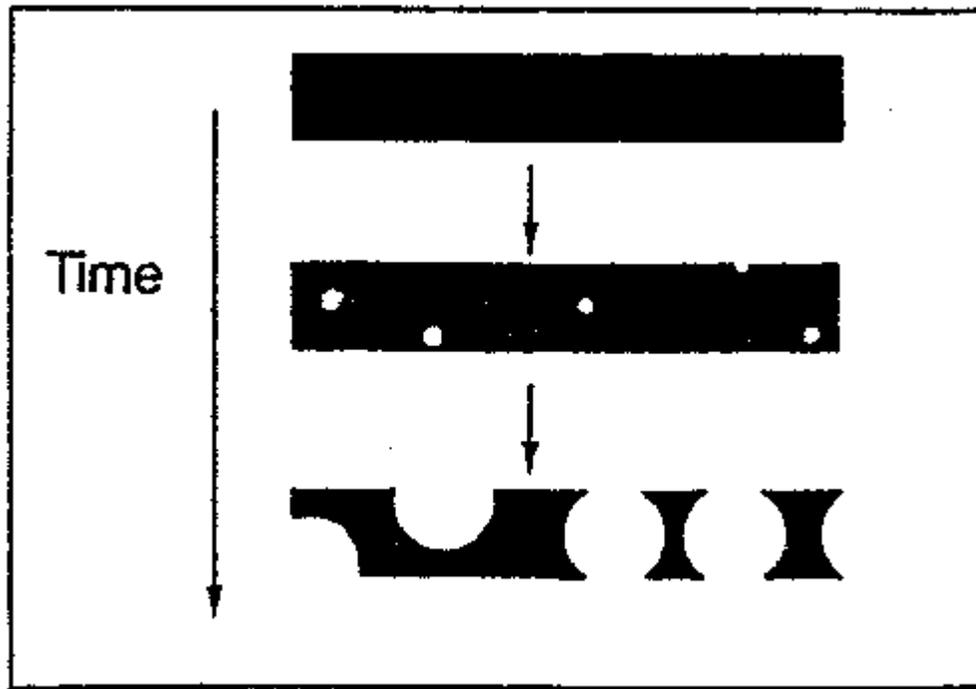
dimension, forme et densité de l'implant, le principe actif, les additifs, la masse molaire du polymère et le site d'implantation (Orloff et coll., 1997). Tous ces paramètres font soulever de nombreux points d'interrogation sur la biocompatibilité d'un implant dégradé (Göpferich, 1996 ; Zange et Kissel, 1997). Il est préférable qu'un matériau se dégrade en sous-produits biologiques comme des acides ou alcools, qui sont éliminés par les voies métaboliques de l'hôte (Langer, 1990 ; Orloff et coll., 1997). La dégradation d'un matériau ne doit en aucune manière être nuisible à l'hôte ; les sous-produits ne doivent pas être toxiques à de faibles concentrations ; la dégradation ne doit pas être trop rapide pour faire accumuler des sous-produits initialement sans danger à des concentrations toxiques (Göpferich, 1996 ; Zange et Kissel, 1997). Inversement, des biomatériaux comme certains polyesters ou encore la soie, ont une dégradation tellement lente ou restreinte à leur surface, qu'ils ont été initialement considérés comme non dégradables voire même inertes puisqu'ils provoquaient une inflammation très faible ou très courte (Woodward, 1999). La vitesse de dégradation d'un polymère peut être régulée par l'ajout d'excipients qui modifient le pH. Dans le cas des systèmes à libération contrôlée, le principe actif lui-même peut remplir cette fonction (Göpferich, 1996). La modification de la structure matricielle du polymère est un autre moyen de régulation de la vitesse de dégradation. Les deux principales méthodes sont la copolymérisation et le mélange de deux polymères. Par exemple, la copolymérisation de l'acide lactique avec de l'acide glycolique et de l'acide sébacique avec du carboxyphénoxypropane (CPP) augmentent respectivement la vitesse de dégradation des polyesters et des polyanhydrides (Anderson et Shive, 1997 ; Göpferich, 1996).

1.2.4.3.2. Dégradation – érosion de masse

La dégradation de masse peut aussi être appelée dégradation homogène (Göpferich, 1996). La plupart des polymères dégradables ont une dégradation de masse (Peppas et Langer, 1994). Ce type de dégradation est caractérisé par une scission des chaînes

polymères qui s'effectue au hasard dans toute l'épaisseur de l'implant. D'une manière générale, la dégradation de masse se déroule de la façon suivante (Figure 8). L'eau pénètre dans le réseau polymère provoquant le gonflement de l'implant. Cette intrusion aqueuse déclenche la dégradation chimique du polymère par scission aléatoire des chaînes et donne naissance à des oligomères et monomères. Les produits de dégradation ont habituellement des propriétés acido-basiques qui modifient le pH dans la masse polymère. La dégradation progressive change la microstructure de la masse polymère par la formation de pores à travers lesquels les oligomères et les monomères sont libérés, entraînant la perte de masse du dispositif polymère (érosion) (Göpferich, 1996).

Les polyesters aliphatiques synthétiques (poly(α -hydroxyester)) sont les polymères les plus exploités en tant que biomatériaux dégradables pour des applications pharmaceutiques et médicales (Göpferich, 1996 ; Pulapura et Kohn, 1992). Cette popularité est plus la conséquence de la réglementation des biomatériaux dans les différents pays que de leurs propriétés (Pulapura et Kohn, 1992). En effet, ils sont approuvés par la FDA pour plusieurs applications médicales actuellement sur le marché comme les sutures (Dexon[®], Vicryl[®], Maxon[®] et Monocryl[®]), les dispositifs orthopédiques (Lactomer[®], Biofix[®] et Phusiline[®]) et les systèmes à libération contrôlée (Decapeptyl[®], Lupron Depot[®] et Zoladex[®]) (Gombotz et Pettit, 1995 ; Grizzi et coll., 1995 ; Pulapura et Kohn, 1992 ; Li et McCarthy, 1999).



(Langer, 1990b)

Figure 8 : Représentation schématique d'un implant caractérisé par une dégradation – érosion de masse du matériau.

1.2.4.3.2.1. Les polymères des acides glycolique et lactique

Les polyesters aliphatiques les plus étudiés sont les poly(acide glycolique) (PGA); les poly(acide lactique) (PLA); et leurs copolymères PLGA. Les formes racémiques de PLA et les PLGA avec une phase amorphe prépondérante ont une dégradation hydrolytique plus rapide que les polymères PLA lévogyres plus cristallins (Anderson et Shive, 1997 ; Li et coll., 1990b et 1990c). Les formes amorphes sont surtout utilisées dans les systèmes à libération contrôlée où une dispersion homogène du principe actif est recherchée au sein d'une matrice monophasique (Hurrell et Cameron, 2002 ; Pulapura et Kohn, 1992). Par contre, les formes plus cristallines sont préférées dans les applications où une certaine

résistance mécanique est nécessaire comme les fils de suture ou les implants orthopédiques (Pihlajamäki et coll., 1997 ; Pulapura et Kohn, 1992).

De manière générale, la dégradation – érosion des implants solides PLGA s’effectue en plusieurs étapes distinctes successives (Gombotz et Pettit, 1995 ; Göpferich, 1996 ; Hurrell et Cameron, 2001a ; Hurrell et Cameron, 2002 ; Li et coll., 1990a, 1990b et 1990c) :

- o L’eau pénètre rapidement dans l’implant puis ce dernier gonfle. La masse molaire ne diminue pratiquement pas.
- o La dégradation de type hydrolytique s’effectue par scission aléatoire des chaînes polymères. La cristallinité augmente et la masse molaire chute mais la masse de l’implant est stable. La pénétration de l’eau devient faible.
- o Lorsque la masse molaire atteint une moyenne critique, les produits de dégradation formés sont assez petits pour diffuser vers l’extérieur. La masse de l’implant diminue et la pénétration de l’eau reprend pour combler l’espace libéré.

L’hydrolyse de la liaison ester s’effectue plus vite en milieux basique et acide par rapport au milieu neutre (Anderson et Shive, 1997 ; Göpferich, 1996). En milieu basique, la dégradation est plus ou moins accélérée parce que même si la scission de la liaison ester est catalysée, les acides carboxyliques terminaux sont neutralisés (Anderson et Shive, 1997). La scission des chaînes polymères plus rapide en milieu acide, explique la dégradation hétérogène autocatalytique, caractéristique des PLGA (Anderson et Shive, 1997 ; Göpferich, 1996). En effet, pour les implants PLGA d’une dimension suffisante, la vitesse de dégradation est plus rapide à l’intérieur qu’à la surface (Ali et coll., 1993b ; Anderson et Shive, 1997 ; Grizzi et coll., 1995 ; Hurrell et Cameron, 2001a ; Li et coll., 1990a, 1990b et 1990c ; Vert et coll., 1994). Des oligomères et monomères solubles de l’acide glycolique et/ou acide lactique sont formés au sein du réseau polymère. Ceux créés en surface diffusent plus facilement dans le milieu environnant alors que ceux dans le centre de l’implant restent emprisonnés. De plus, le milieu environnant fait office de solution tampon en neutralisant les groupements terminaux carboxyliques à la surface de l’implant. Le pH

devient par conséquent bien plus acide à l'intérieur qu'à la surface de l'implant (Ali et coll., 1993b ; Grizzi et coll., 1995 ; Hurrell et Cameron, 2001a et 2002 ; Li et coll., 1990a, 1990b et 1990c ; Li et McCarthy, 1999 ; Vert et coll., 1994). C'est pourquoi la dégradation par hydrolyse est plus rapide au centre. Au fur et à mesure que la masse molaire diminue, les chaînes du réseau polymère se relâchent progressivement permettant à une plus grande quantité d'eau de diffuser à l'intérieur du polymère, phénomène qui accentue d'autant plus l'hydrolyse (Ali et coll., 1993b ; Hurrell et Cameron, 2001a et 2002 ; Li et coll., 1990a, 1990b et 1990c ; Vert et coll., 1994). Pendant toutes ces étapes, l'implant PLGA conserve sa forme initiale mais sa résistance mécanique diminue fortement ce qui limite son utilisation dans les applications orthopédiques (Li et coll., 1990a ; Uhrich et coll., 1998). Quand le polymère atteint une masse molaire critique minimale, l'érosion débute avec la diffusion massive des produits de dégradation solubles du centre à travers une pseudo-membrane de surface (couche de polymère externe moins vite dégradée) qui devient de plus en plus mince et lâche. L'implant devient alors creux et perd ensuite sa forme en se flétrissant (Ali et coll., 1993b ; Grizzi et coll., 1995 ; Li et coll., 1990a, 1990b et 1990c). Cette dégradation – érosion hétérogène autocatalytique n'a lieu qu'avec des implants solides d'une dimension suffisante où les oligomères et monomères restent emprisonnés à l'intérieur pendant quelque temps (Anderson et Shive, 1997 ; Grizzi et coll., 1995 ; Li et coll., 1990a, 1990b et 1990c). En effet une dégradation homogène a été observée avec des microsphères d'un diamètre inférieur à 300 μm (Anderson et Shive, 1997 ; Grizzi et coll., 1995), des films de 300 μm d'épaisseur (Grizzi et coll., 1995) et des éponges poreuses de 800 – 900 μm d'épaisseur (Lu et coll., 2000) où la vitesse de dégradation est identique entre la surface et l'intérieur du polymère PLGA. Pour une même composition PLGA, la vitesse de la dégradation homogène est plus lente que celle de la dégradation hétérogène autocatalytique (Grizzi et coll., 1995). Avec des implants de très petite taille, les oligomères et/ou monomères sont capables de diffuser à l'extérieur aussitôt qu'ils deviennent solubles, limitant ainsi l'accumulation des produits de dégradation responsable du phénomène autocatalytique dans les implants plus grands.

La libération de produits de dégradation acides libérés par les implants PLGA doit être surveillée de près pour la biocompatibilité. D'une manière générale, les oligomères et monomères de l'acide glycolique et de l'acide lactique sont bien tolérés par les tissus et sont finalement éliminés par la voie du cycle de Krebs (Göpferich, 1996 ; Zange et Kissel, 1997). Cependant, dans le cas d'une implantation à long terme et/ou dans un site à faible flux de fluide comme le tissu osseux et cartilagineux, il est à craindre une réaction inflammatoire inadéquate avec l'accumulation des acides organiques de dégradation (Ambrosio et coll., 2002). Par ailleurs, la dégradation hétérogène des implants PLGA a évidemment un effet sur la cinétique de libération d'un produit quand ils sont utilisés sous forme de systèmes à libération contrôlée. La libération d'un principe actif s'effectue généralement en deux phases (Gombotz et Pettit, 1995 ; Hurrell et Cameron, 2001b ; Ramchandani et Robinson, 1998 ; Vert et coll., 1994) : la première correspond à la solubilisation et à la diffusion du principe actif situé à proximité de la surface alors que la deuxième survient lors de l'érosion du centre du polymère qui libère les molécules emprisonnées. Ce phénomène est à prendre en considération dans l'évaluation de la biocompatibilité d'un implant PLGA parce que la libération biphasique peut être inefficace pour certains traitements ou même être toxique lors de la libération massive liée à l'érosion (Vert et coll., 1994). Parallèlement, la nature acide ou basique de l'agent thérapeutique incorporé dans le polymère est un autre facteur à prendre en compte dans la biocompatibilité d'un implant PLGA à libération contrôlée parce qu'il vient modifier la vitesse de dégradation du polymère (Anderson et Shive, 1997 ; Li et coll., 1990a ; Vert et coll., 1994).

In vivo, toutes les étapes de dégradation décrites *in vitro* restent valables mais la vitesse est accrue par les enzymes, les radicaux libres et les changements de pH produits par l'activité des cellules inflammatoires (Ali et coll., 1993b ; Therin et coll., 1992 ; Holy et coll., 1999). Les macrophages et les cellules géantes à l'interface d'un implant PLGA, produisent des agents acides qui diminuent le pH localement et accélèrent la dégradation (Anderson et Shive, 1997). De plus, par rapport aux conditions *in vitro*, il a été démontré

que la dégradation d'éponges PLGA implantées chez le rat a été plus rapide suite au phénomène d'autocatalyse des produits de dégradation acides accumulés localement (Lu et coll., 2000). Même si la dégradation *in vivo* des PLGA est caractérisée essentiellement par hydrolyse, il existe aussi une dégradation par phagocytose macrophagique (Anderson et Shive, 1997 ; Holy et coll., 1999 ; Prior et coll., 2002). Cependant, les particules PLGA ne doivent pas dépasser une certaine taille pour se faire. Dans le cas des microsphères, le diamètre maximum est de 10 μm pour être phagocytées. En fait, la dégradation – érosion se fait d'abord par hydrolyse et/ou phagocytose frustrée par des macrophages et cellules géantes qui entourent les trop grandes particules, jusqu'à ce que elles atteignent ensuite une dimension suffisamment réduite susceptible de permettre la phagocytose (Anderson et Shive, 1997).

1.2.4.3.2.2. Autres polyesters

Les poly(ϵ -caprolactone) (PCL) sont aussi des polyesters aliphatiques semi-cristallins qui ont été parmi les premiers polymères synthétisés au début des années 30. Avec une dégradation plus lente que celle des PLA, les PCL peuvent être utilisés pour des systèmes à libération contrôlée actifs pendant un an (Pulapura et Kohn, 1992). Les PCL ont été exploités en tant que biomatériaux de prothèses, sutures et systèmes à libération contrôlée (Ali et coll., 1993a ; Pitt et coll., 1981 ; Woodward et coll., 1985). La première phase de la dégradation *in vivo* d'implants PCL est essentiellement de type hydrolytique par scission aléatoire des chaînes polymères au niveau des liaisons ester, accompagnée d'une diminution de la masse molaire et d'une augmentation de la cristallinité sans pour autant qu'il y ait perte de masse (Pitt et coll., 1981a et 1981b). Cette phase dure au moins six mois quand les implants PCL sont des cylindres à surface lisse. Pendant ces six mois, la réponse de l'hôte se limite au développement d'une capsule fibreuse contenant quelques cellules géantes. Ensuite, quand la masse molaire a chuté, la deuxième phase débute avec une fragmentation du polymère (Woodward et coll., 1985). Il s'ensuit une réponse à corps étranger avec la présence de cellules géantes et de macrophages et le développement d'une

vascularisation au contact des fragments. De type phagocytaire à ce stade, la dégradation – érosion du polymère est accélérée et s’accomplit en trois mois.

Les polyesters aliphatiques ont été utilisés avec d’autres polymères pour former des copolymères avec une meilleure biocompatibilité parce que leurs caractéristiques sont mieux adaptées à l’utilisation visée. C’est ainsi que des PLGA ont été associés à des poly(phosphazène) afin de diminuer l’acidité locale lors de la libération des produits de dégradation acides (Ambrosio et coll., 2002). Par ailleurs, des barres (15 mm x 3 mm x 3 mm) en copolymère de PLA et PCL ont permis d’avoir une réaction inflammatoire granulomateuse très faible malgré une dégradation lente, permettant ainsi une bonne biocompatibilité pour l’utilisation sous forme de supports guides dans la reconstruction des nerfs (Den Dunnen et coll., 1997). Enfin, avec des polyuréthanes à base de polymères de ϵ -caprolactone et d’acide L-lactique, ayant une macroporosité (150 – 300 μm) et une microporosité secondaire variable, il a été observé que la croissance fibrovasculaire à l’intérieur du matériau est complétée avant le début de sa dégradation uniquement si les micropores ont un diamètre supérieur à 30 μm (Van Tienen et coll., 2002). Cette infiltration tissulaire totale du biomatériau est recherchée pour les prothèses de ménisque du genou. Si le matériau n’a pas une porosité adéquate, la biodégradation de la prothèse devient trop rapide, son rôle mécanique temporaire est entravé et sa biocompatibilité compromise.

1.2.4.3.3. Dégradation – érosion de surface

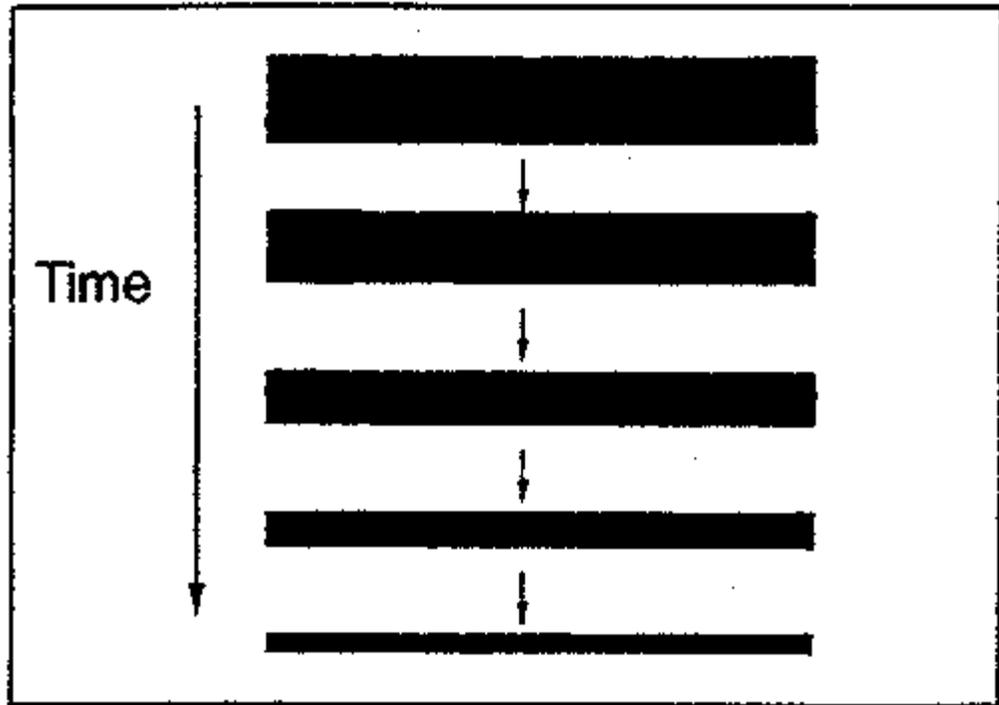
Par opposition à la dégradation de masse, la dégradation de surface est appelée dégradation hétérogène. Les polymères perdent leur matériel uniquement à partir de leur surface (Göpferich, 1996). L’avantage de ce mode de dégradation – érosion est une prévision plus aisée de ses caractéristiques. Ainsi la dégradation de surface permet plus facilement de réguler la vitesse de dégradation d’un matériau. Cette caractéristique devient un avantage très recherché dans le domaine des implants à libération contrôlée (Göpferich, 1996 ; Peppas et Langer, 1994 ; Pulapura et Kohn, 1992). La vitesse de libération du

principe actif devient proportionnelle à celle de la dégradation du polymère. Le mécanisme de libération de la molécule fixée au polymère dépend de la dégradation de ce dernier (Göpferich, 1996 ; Langer, 1990). L'innocuité et la biocompatibilité d'un tel système sont accrues car le phénomène de « dose dumping » est écarté (Langer, 1990 ; Peppas et Langer, 1994). Cependant la vitesse de libération peut être altérée par la dégradation de surface quand les deux phénomènes entrent en compétition. Ce peut être le cas avec un système réservoir à libération par diffusion qui s'érode trop rapidement. Ce problème est généralement évité en modifiant le polymère avec certains additifs pour maîtriser la vitesse d'érosion (Langer, 1990 ; Pulapura et Kohn, 1992).

Avec un système à libération contrôlée dont le matériau est caractérisé par une dégradation de surface, il est aisé de contrôler la vitesse de libération en modifiant d'une part l'épaisseur de l'implant et d'autre part la quantité de principe actif (charge) incorporé dans le polymère (Langer, 1990). En se dégradant uniquement en surface, l'implant devient de plus en plus petit avec le temps tout en gardant sa forme géométrique initiale sans se détruire en plusieurs morceaux (Figure 9), ce qui donne un certain avantage par rapport à la dégradation – érosion de masse si un rôle mécanique temporaire est visé en plus de la libération contrôlée (Göpferich, 1996 ; Pulapura et Kohn, 1992).

La phagocytose par les cellules inflammatoires à l'interface de l'implant est aussi un mécanisme de dégradation de surface qui peut se produire *in vivo* alors que le matériau semblait inerte *in vitro*. Il s'agit du mécanisme de dégradation par réaction enzymatique active (Göpferich, 1996). Le matériau de référence pour ce type d'érosion est le fil suture Catgut[®] (Sewell et coll., 1955). Les céramiques biodégradables connaissent aussi cette érosion de type phagocytaire avec l'intervention des macrophages et des cellules géantes (Remes et Williams, 1992). Le système du complément active l'adhésion des macrophages à la surface du matériau et facilite ainsi la phagocytose. Le complément va aussi stimuler la phagocytose « frustée » où les macrophages déversent leur contenu enzymatique lysosomal dans le milieu extracellulaire de l'interface, faute de pouvoir phagocyter le matériau

directement (Remes et Williams, 1992). Finalement, la résorption de surface par phagocytose est en général une combinaison de dégradation extra et intracellulaire puisqu'il faut d'abord segmenter le matériau avant de l'ingérer.



(Langer, 1990b)

Figure 9 : Représentation schématique d'un implant caractérisé par une dégradation – érosion de surface du matériau.

Les deux grandes familles de polymères caractérisées par une dégradation hydrolytique de surface, sont les poly(orthoester) et les polyanhydrides. Ces polymères sont formés d'unités monomères hydrophobes avec des liaisons hydrolabiles expliquant leur dégradation en surface (Peppas et Langer, 1994 ; Pulapura et Kohn, 1992). En effet, pour

obtenir une érosion de surface, la vitesse de dégradation du polymère doit être bien plus rapide que la vitesse de pénétration de l'eau dans la masse polymère (Langer, 1990).

1.2.4.3.3.1. Les poly(orthoester)

Les POE sont des polymères extrêmement hydrophobes et la liaison labile orthoester ne s'hydrolyse pas rapidement en général, même en milieu aqueux. Les produits de dégradation qui en découlent, sont des alcools (diols ou triols) et des acides carboxyliques (acide acétique, glycolique ou lactique) (Heller et coll., 2001 ; Zignani et coll., 2000). La liaison orthoester résiste au milieu basique et se dégrade plus vite en milieu acide par rapport à un milieu neutre (Gombotz et Pettit, 1995 ; Göpferich, 1996 ; Heller et coll., 2001 ; Pulapura et Kohn, 1992). Comme les PLGA, les produits de dégradation acides des POE catalysent l'hydrolyse subséquente du reste du polymère. Par contre, à la différence des PLGA, ces produits acides ne sont formés qu'en surface et peuvent donc facilement diffuser sans s'accumuler dans le polymère en risquant d'accélérer son hydrolyse (Heller et coll., 2001). Il a été démontré que les POE ont une bonne biocompatibilité quand ils sont implantés chez le rat en région sous-cutanée (Bernatchez et coll., 1993). Cependant, la libération des enzymes au cours de la réaction inflammatoire fait diminuer le pH du site d'implantation (Anderson, 1994a ; Cotran et coll., 1994 ; Woodward, 1999). Or le pH du fluide à l'interface de l'implant a un effet sur la vitesse de dégradation du POE (Heller et coll., 2001 ; Pulapura et Kohn, 1992). Les enzymes libérées (hydrolases et estérases) par les macrophages créent un environnement acide et peuvent alors accélérer la vitesse de dégradation des implants POE. De ce fait, les produits de dégradation acides s'accumulent plus rapidement au site d'implantation et peuvent entretenir la réaction inflammatoire (Zignani et coll., 2000). Pour améliorer la tolérance déjà acceptable des POE (Bernatchez et coll., 1993), des excipients basiques (hydroxyde de magnésium) ont été ajoutés permettant aussi de prolonger le temps de libération d'une substance grâce une dégradation ralentie (Göpferich, 1996 ; Zignani et coll., 2000). Les implants parallélépipédiques de POE sont de bons candidats à la libération contrôlée parce

qu'ils ont tendance à libérer un principe actif inclus dans la matrice polymère, à une vitesse constante (Pulapura et Kohn, 1992). Par conséquent, le mécanisme de libération est principalement contrôlé par l'érosion de surface du polymère (Heller et coll., 2001). À un bien moindre degré, les POE subissent aussi une dégradation de masse puisqu'il a été montré que la masse molaire de la partie non érodée diminue avec le temps. Cependant, à l'inverse des PLGA, cette dégradation minimale ne fait pas chuter de façon significative le pH dans le polymère, évitant ainsi de dénaturer un principe actif sensible au milieu acide (Heller et coll., 2001).

1.2.4.3.3.2. Les polyanhydrides

Les polyanhydrides les plus étudiés en tant que biomatériaux sont les dérivés de l'acide sébacique et de CPP. En matière de dégradation, les polyanhydrides sont chimiquement les biomatériaux les plus réactifs et les plus instables (Pulapura et Kohn, 1992). Ils sont principalement utilisés pour la libération contrôlée d'un principe actif (D'Emanuele et coll., 1992 ; Pulapura et Kohn, 1992). La vitesse de dégradation – érosion de surface est contrôlée par la nature des monomères qui forment les chaînes principales (D'Emanuele et coll., 1992) : les polyanhydrides aliphatiques se dégradent en quelques jours et les aromatiques en plusieurs années (Göpferich, 1996 ; Pulapura et Kohn, 1992). C'est pourquoi les deux types sont habituellement utilisés ensemble pour obtenir des vitesses de dégradation intermédiaires (Pulapura et Kohn, 1992). La vitesse de dégradation d'un implant polyanhydride peut décupler quand le pH du milieu environnant passe de 7.4 à 10 (Göpferich, 1996). Il existe une période d'induction de quelques heures où l'érosion de surface est lente et la masse molaire du polymère chute de façon drastique, correspondant donc à une phase de dégradation. Cette période d'induction correspondrait à la transformation d'une surface hydrophobe en surface hydrophile au fur et à mesure de l'hydrolyse, permettant ainsi une meilleure prise d'eau et une solubilisation des produits de dégradation qui finissent par diffuser (D'Emanuele et coll., 1992). Ces produits de dégradation sont des acides carboxyliques et des esters qui modifient le pH à l'intérieur des

pores d'érosion (Göpferich, 1996). Les polyanhydrides ont en général une excellente biocompatibilité (D'Emanuele et coll., 1992 ; Pulapura et Kohn, 1992). Avec des copolymères CPP – imides implantés en région sous-cutanée chez le rat, il a été observé qu'il y a d'abord une hydrolyse rapide de la liaison anhydride de l'imide suivi d'une hydrolyse plus lente de la liaison anhydride CPP, révélant ainsi l'importance de la nature des monomères et de leur solubilité *in vivo* (Uhrich et coll., 1998).

1.2.4.4. Infection de l'implant : un devenir sans avenir

Le développement d'une infection péri-implant est un scénario qui compromet automatiquement la biocompatibilité et l'avenir de tout matériau implanté. En effet, une des complications majeures en implantologie est l'apparition d'une infection au site d'implantation (An et Friedman, 1998 ; Higashi et Marchant, 1999 ; Schierholz, 2001). Quel que soit le rôle du dispositif à implanter, le développement d'une infection après implantation est toujours un risque potentiel (Petty et coll., 1985) qui vient sérieusement compromettre la biocompatibilité et par conséquent le succès clinique de l'implant en question. Bien que l'incidence d'infection soit relativement faible pour la plupart des dispositifs médicaux ($\leq 5\%$), elle peut atteindre 10 % avec les cathéters urétraux et les pacemakers, et même 36 % avec les cœurs artificiels (Higashi et Marchant, 1999 ; Schierholz, 2001). Quelle que soit l'incidence, la morbidité et la mortalité associées à ces infections sont élevées. De surcroît, avec l'utilisation croissante des dispositifs implantables, les coûts inhérents aux traitements de ces infections peuvent devenir nuisibles au développement de ce domaine. En effet, le traitement des infections d'implants peut être 5 à 7 fois plus onéreux que l'implantation seule qui perd alors tout intérêt par rapport aux autres modes de traitement (Higashi et Marchant, 1999). Ces infections ne sont pas à négliger quand chaque année, plus de 35 millions de chirurgies aux États-Unis font appel à des implants en tout genre (Higashi et Marchant, 1999), et quand un million de prothèses totales de hanche et 250 000 prothèses du genou sont utilisées à travers le monde (Schierholz, 2001 ; Schierholz et Beuth, 2001). Les implants sont impliqués dans 45 % de

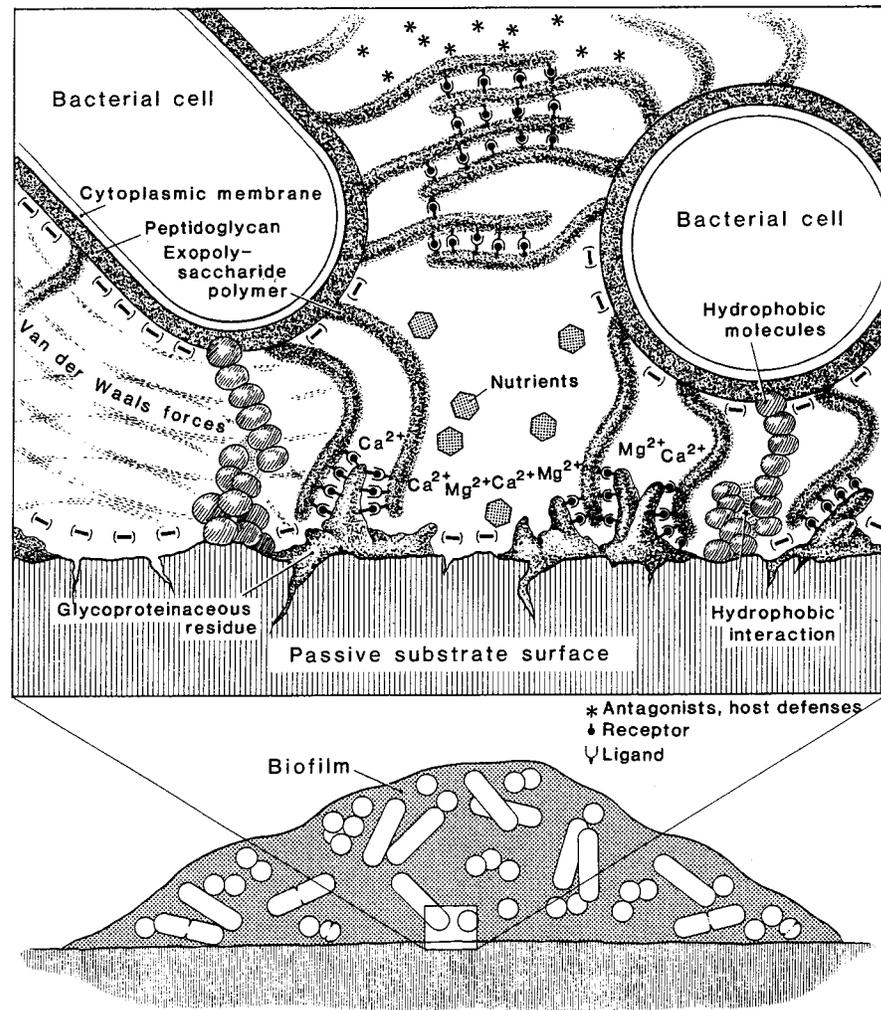
toutes les infections nosocomiales (Schierholz et Beuth, 2001). Plus de 100 000 des infections nosocomiales du compartiment sanguin ont lieu chaque année aux États-Unis avec une mortalité annuelle qui s'élève entre 10 000 et 20 000 cas et dont le coût est estimé à un milliard de dollars. Au moins la moitié de ces cas est associée à la présence d'un cathéter veineux central (Schierholz, 2001). En effet, les cathéters en tout genre sont le meilleur exemple des infections liées à un biomatériau. Plus de 30 % des patients hospitalisés ont au moins un cathéter installé et plus de 10 % ont un cathéter urinaire (Schierholz et Beuth, 2001). Les infections urinaires se produisent chez 20 % et 40 % des patients ayant un cathéter de Foley en place pendant 10 et 25 jours, respectivement (Schierholz, 2001).

La plupart des micro-organismes qui contaminent les implants proviennent de la peau de l'hôte et/ou du chirurgien ou ont une origine nosocomiale (Higashi et Marchant, 1999 ; Schierholz et Beuth, 2001). Les agents étiologiques les plus fréquemment rencontrés sont *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Higashi et Marchant, 1999) mais le profil microbien des infections reliées aux matériaux dépend essentiellement du type d'implant et du site d'implantation (Schierholz et Beuth, 2001). Au moment des sutures, *S. aureus* est retrouvé sur les plaies chirurgicales dans 90 % des cas, alors qu'elles étaient préalablement désinfectées. Une contamination mineure du site d'implantation peut être perçue comme un phénomène habituel et c'est la présence simultanée de plusieurs facteurs favorisants qui conditionne le développement de l'infection péri-implant (Schierholz et Beuth, 2001). Il arrive aussi que les infections d'implants soient polymicrobiennes où un mode de croissance symbiotique se met en place entre des formes aérobies et anaérobies (Gristina et coll., 1985).

La mise en place d'un implant a pour première conséquence la destruction de tissus qui se solde par la rupture de barrières physiques naturelles protectrices ce qui donne l'opportunité d'une éventuelle invasion microbienne (Higashi et Marchant, 1999 ; Schierholz et Beuth, 2001). De plus, l'implant peut dévier la réponse de l'hôte. Ainsi,

l'inoculum nécessaire pour établir une infection en présence d'un biomatériau est bien moindre que celui en temps normal. Le chimiotactisme des neutrophiles vers l'infection n'est pas affecté, par contre la phagocytose et l'activité oxydante des cellules inflammatoires sont atténuées, diminuant leur pouvoir bactéricide (Higashi et Marchant, 1999 ; Woo et coll., 2001). Alors une infection chronique s'installe (Schierholz et Beuth, 2001).

Dans la majorité des cas, les infections d'implants résistent à l'antibiothérapie et la seule solution thérapeutique est le retrait de l'implant infecté (An et Friedman, 1998 ; Gristina et coll., 1985 ; Higashi et Marchant, 1999 ; Schierholz et Beuth, 2001). Au niveau cellulaire, l'étape critique initiale dans la pathogénèse de l'infection d'implant est l'adhérence de la bactérie à l'implant (Figure 10). En effet, les micro-organismes sont capables de se fixer solidement à des surfaces artificielles puis de se diviser et coloniser ces surfaces pour produire un exopolysaccharide matriciel (glycocalix) qui forme un biofilm protecteur (Figure 10) à l'intérieur duquel se développent les microcolonies (An et Friedman, 1998 ; Gristina et coll., 1985 ; Higashi et Marchant, 1999 ; Owusu-Abadio et coll., 1999 ; Schierholz et Beuth, 2001 ; Woo et coll., 2001). Ce biofilm augmente significativement la chance de survie des agents pathogènes parce qu'il forme un véritable bouclier résistant à l'hôte et aux antibiotiques (An et Friedman, 1998 ; Gristina et coll., 1985 ; Higashi et Marchant, 1999 ; Owusu-Abadio et coll., 1999 ; Woo et coll., 2001). Fixé sur le glycolcalyx, l'antibiotique ne peut pas pénétrer à l'intérieur du biofilm. Ce dernier se modifierait pour devenir encore plus résistant après exposition à l'antibiotique (Owusu-Abadio et coll., 1999 ; Schierholz et Beuth, 2001). Il a même été démontré *in vitro* qu'une croissance de *S. aureus* avec développement d'un biofilm, est possible à la surface de ciments osseux (PMMA) imprégnés de gentamicine, malgré la libération de l'antibiotique (Van de Belt et coll., 2001).



(Gristina et coll., 1985)

Figure 10 : Formation d'un biofilm par adhérence bactérienne à la surface d'un implant.

L'adhérence entre une bactérie et la surface d'un substrat artificiel résulte des interactions spécifiques ou non. La bactérie adhère directement au biomatériau ou aux cellules et protéines adsorbées (Figure 10). Les forces intermoléculaires de surface sont déterminées par les propriétés physico-chimiques des surfaces microbienne et artificielle, le tout sous l'influence des propriétés du fluide biologique environnant comme le pH et la

force ionique (An et Friedman, 1998 ; Gristina et coll., 1985 ; Higashi et Marchant, 1999 ; Schierholz et Beuth, 2001). Dans une première phase, des interactions physico-chimiques instantanées et réversibles s'établissent entre la surface de la bactérie et celle du matériau (An et Friedman, 1998). Les surfaces de la bactérie et du matériau sont habituellement chargées négativement et restent donc à une distance spécifique qui résulte des forces répulsives (Gristina et coll., 1985). Cependant les forces de Van der Waals contrent cette répulsion en créant des dipôles sur les molécules des deux surfaces, maintenant ces dernières à une distance critique qui permet la mise en place subséquente d'interactions hydrophobes. Dans une deuxième phase, prennent place entre les deux surfaces des interactions moléculaires et cellulaires irréversibles qui nécessitent du temps pour se former (An et Friedman, 1998). L'exposition entre les deux surfaces est suffisamment proche et durable pour que la bactérie adhérente finisse par s'attacher solidement à l'aide de ses exopolysaccharides sur des glycoprotéines fixées à la surface de l'implant qui résultent de l'adsorption initiale des protéines de l'hôte déjà décrite antérieurement. Enfin la bactérie adhérente forme d'autres liens avec le matériau et les autres bactéries. Elle utilise alors l'implant comme un échafaudage pour ériger le biofilm avec d'autres bactéries où chacune vit dans des conditions physiologiques favorables avec suffisamment de nutriments. Le développement du biofilm se propage ainsi de manière exponentielle jusque dans les régions stériles (Gristina et coll., 1985).

Le succès de la biocompatibilité d'un implant correspond à une bonne intégration tissulaire qui évite l'infection. L'orientation vers l'un ou l'autre scénario est le résultat d'une compétition à la surface du matériau, entre les macromolécules, les cellules de l'hôte et les bactéries (Schierholz et Beuth, 2001). À cause de ce risque permanent d'infection pour tout biomatériau implanté, l'approche initiale de fabriquer des implants avec des surfaces chimiquement « inertes » a été reconsidérée étant donné que ce type de surface a tendance à provoquer une réaction inflammatoire chronique qui se solde en une intégration tissulaire incomplète laissant une opportunité constante à tout pathogène (Higashi et Marchant, 1999). Par ailleurs, ces complications devraient diminuer avec le développement

de méthodes alternatives comme la combinaison de nouveaux matériaux ayant une meilleure biocompatibilité et de principes actifs antimicrobiens pour former des implants à rôles divers mais tous avec la faculté de libération contrôlée (Schierholz, 2001 ; Schierholz et Beuth, 2001).

1.2.5. Biocompatibilité de l'amidon

Les polysaccharides occupent une position centrale parmi les polymères naturels. La chitine et ses dérivés (chitosans), la cellulose, différents dextrans, l'acide hyaluronique et enfin l'amidon sont des polysaccharides qui ont été suggérés en tant que biomatériaux potentiels (Gombotz et Pettit, 1995 ; Pulapura et Kohn, 1992). Une bonne biocompatibilité a été démontrée avec la cellulose (Mårtson et coll., 1999), les chitosans (Mi et coll., 2002 ; Rao et Sharma, 1997) et les dextrans (Draye et coll., 1988). La biocompatibilité de l'amidon aussi a été étudiée, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les macrophages ne changent pas de morphologie et sont faiblement stimulés quand ils sont mis en contact *in vitro* avec des microparticules d'amidon (Artursson et coll., 1987a et 1989), contrairement au dextran, mannan et lichenan qui se montrent cytotoxiques (Artursson et coll., 1987a). Ces mêmes microparticules d'amidon ne sont pas immunogènes chez la souris et stimulent faiblement les lymphocytes *in vitro* (Artursson et coll., 1986). Elles n'ont pas d'effet sur l'activité cytotoxique des macrophages (Artursson et coll., 1987b) malgré une stimulation de la libération de IL-1 (Artursson et coll., 1986 et 1987b).

Il a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* que l'amidon est phagocyté par les macrophages (Artursson et coll., 1987a, 1988 et 1989). Cependant, seules les microparticules sont phagocytées alors que les fragments solubles d'amidon sont absorbés par pinocytose (Artursson et coll., 1986). Après injection intraveineuse chez la souris et le rat, il a été démontré que les microparticules d'amidon sont rapidement éliminées du compartiment sanguin par le système réticulo-endothélial pour se retrouver majoritairement dans le tissu hépatique (Artursson et coll., 1984 ; Laakso et coll., 1986 ; Artursson et

coll., 1988). Les α -glucosidases peuvent alors dégrader complètement l'amidon dans les lysosomes des macrophages où ont été localisées les microparticules. Ce mode de biodégradation de l'amidon *in vivo* peut trouver un intérêt pour cibler de grandes quantités d'un principe actif vers les lysosomes du système réticulo-endothélial (Artursson et coll., 1984 ; Laakso et coll., 1986).

L'amidon a d'abord été utilisé sous forme de microsphères pour provoquer une embolisation localisée temporaire par injection intra-artérielle. Des microsphères d'environ 40 μm de diamètre ont été injectées dans une branche de l'artère fémorale et dans une branche entre les artères mésentériques supérieure et inférieure chez le rat (Fosberg, 1978), dans l'artère mésentérique supérieure chez le porc (Arfors et coll., 1976) et dans l'artère hépatique chez l'Homme (Dakhil et coll., 1982). Cette embolisation est recherchée en cancérologie soit pour induire en aval une hypoxie du tissu tumoral lors de radiothérapie (Arfors et coll., 1976 ; Fosberg, 1978), soit pour augmenter en amont, par stase sanguine, la concentration locale d'un agent anticancéreux injecté simultanément lors d'une chimiothérapie (Dakhil et coll., 1982). Au cours de ces études, il a été démontré que les microsphères d'amidon avaient une bonne hémocompatibilité sans causer de complications (thrombose par exemple) et surtout qu'elles étaient dégradables permettant ainsi le rétablissement complet d'une circulation locale normale. Il est admis que cette biodégradation a été possible grâce à l'action de l' α -amylase sérique (Arfors et coll., 1976 ; Dakhil et coll., 1982 ; Forsberg, 1978).

Parallèlement, il est intéressant de noter que le Contramid[®] est dégradé *in vitro* par l' α -amylase en trois oligosaccharides solubles soient le glucose, le maltose et le maltotriose (Rahmouni et coll., 2001). Le profil d'érosion est composé de deux phases. Pendant la première phase, l'érosion est rapide et dépend de la concentration en enzyme digestive mais de façon non linéaire. La durée de cette première phase dépend aussi de la concentration en α -amylase (2 – 4 h). L'adsorption de l'enzyme sur le polymère peut devenir un facteur limitant quand la concentration augmente. Pendant la deuxième phase, l'érosion ralentit et

dépend moins de la concentration enzymatique. Une éventuelle augmentation de la cristallinité du polymère au cours de la dégradation peut se produire, limitant ainsi l'activité de l'enzyme.

Par ailleurs, des microsphères d'amidon ont été administrées deux fois par jour chez le lapin dans la cavité nasale pendant huit semaines (Björk et coll., 1991). Une bonne biocompatibilité de ces microsphères a été observée au niveau de la muqueuse nasale, sans signe d'inflammation ni de lésion histologique comme une érosion ou une métaplasie squameuse. La seule modification observée était une légère hyperplasie de l'épithélium du septum nasal en réponse à une déshydratation locale à cause de la prise d'eau des microsphères. La morphologie des cils était normale et les propriétés protectrices de la couche de mucus étaient inchangées.

De la poudre d'amidon avec 10 % de Carbopol[®] 974 P (polymère de l'acide acrylique), utilisée comme bioadhésif en administration par voie nasale, s'est révélée biocompatible (Callens et coll., 2001). La poudre du mélange a accru la production de mucus nasal mais ne l'a pas modifié d'un point de vue qualitatif. Une légère augmentation du nombre de granulocytes a été observée au contact du mélange amidonné mais la libération de protéines et d'enzymes (lactate déshydrogénase et phosphatase alcaline) n'a pas changé indiquant aucune lésion de la muqueuse.

Enfin, l'amidon a été associé à du vinyl alcool d'éthylène (40 %) pour servir de ciment osseux en chirurgie orthopédique (Mendes et coll., 2001). *In vitro*, aucune cytotoxicité n'a été observée avec ce copolymère amidonné. *In vivo*, des tiges cylindriques du copolymère (diamètre : 0,5 cm ; longueur : 0,7 cm) placées dans le muscle et l'os cortical chez la chèvre, se sont révélées biocompatibles en induisant une réponse tissulaire satisfaisante histologiquement.

En conclusion de ce chapitre, la biocompatibilité est une notion évolutive qui doit suivre les nouveautés en implantologie (nouveau matériau, nouveau système, nouvelle technologie ou nouvelle application). Avec le besoin permanent de connaître les limites de nouveaux biomatériaux, il est essentiel de développer sans cesse de meilleures approches et méthodes afin de prédire la durabilité et la performance *in vivo* de ces biomatériaux conçus sous forme de systèmes implantables. Les progrès dans l'évaluation de la biocompatibilité iront de pair avec ceux des matériaux eux-mêmes assurant ainsi la naissance de nouvelles générations de biomatériaux.

1.3. Les implants à libération contrôlée

1.3.1. Description

1.3.1.1. Historique

Les matériaux implantés ont d'abord été utilisés pour l'assistance à la réparation d'un tissu comme par exemple les fils de suture et les dispositifs orthopédiques. Les premiers témoignages de l'utilisation d'implants remontent au temps des Égyptiens qui pratiquaient des points de suture dès 4000 avant J.C. et installaient des implants métalliques pour les réductions de fractures vers 2000 avant J.C. (Pulapura et Kohn, 1992).

L'utilisation d'implants pour la libération d'un principe actif est un concept très récent. Effectivement, jusqu'à la première moitié du vingtième siècle, la connaissance était limitée sur les formes galéniques, les systèmes de libération, les concentrations sériques toxiques ou thérapeutiques et l'administration intraveineuse (Dash et Cudworth, 1998). Le concept d'implants à libération contrôlée remonte seulement aux années 30, où des implants d'œstrogène pur avaient montré une efficacité de trois mois, après administration sous-cutanée chez des chapons (Danckwerts et Fassih, 1991). L'idée d'administrer des

hormones en médecine vétérinaire, notamment des stéroïdes, via des implants, est devenue monnaie courante dans les années 50, afin d'augmenter la croissance et l'efficacité alimentaire chez les animaux de production (Dash et Cudworth, 1998 ; Langer et Peppas, 1981).

En médecine humaine, la recherche sur les systèmes à libération contrôlée a commencé sous forme de curiosité vers la fin des années 60 pour devenir, de nos jours, un domaine majeur et une véritable industrie (Ratner, 2002). Pendant les trois dernières décennies, la recherche dans le domaine de la libération contrôlée de médicaments s'est beaucoup concentrée sur la maîtrise de la vitesse de libération d'un agent thérapeutique pour maintenir des concentrations sériques efficaces d'un point de vue pharmacologique et ce pour une période de temps prolongée (Park et Park, 1996). De nos jours, la technologie en libération contrôlée est capable d'obtenir des cinétiques d'ordre zéro sur de longues périodes. Certains systèmes ne permettent la libération d'un médicament que dans les conditions physiologiques environnementales caractéristiques au profil pathologique visé (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Langer, 1990). Parmi les premiers systèmes implantables à libération contrôlée mis sur le marché en médecine humaine, on retrouve d'une part un implant à base de silicone (Norplant[®]) contenant du levonorgestrel, molécule de contraception chez la femme, et d'autre part, un implant PLGA contenant un agoniste du facteur de libération de l'hormone lutéïnisante (LHRH) pour le traitement du cancer de la prostate (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998).

D'un point de vue général, la croissance exponentielle de l'industrie des polymères après la deuxième Guerre Mondiale, a permis la découverte de nombreux matériaux avec des propriétés fort intéressantes (Pulapura et Kohn, 1992). Les biomatériaux actuellement disponibles ont été retenus par tri aléatoire des polymères commerciaux. Par exemple, le cœur artificiel Jarvik 7 a été conçu avec des polymères utilisés pour les corsets de femmes, et des tubes de dialyse fabriqués avec de l'enveloppe pour saucisses. Cependant, une

approche scientifique plus judicieuse est actuellement appliquée avec une conception de polymères spécifiques aux applications biomédicales visées (Pulapura et Kohn, 1992).

1.3.1.2. Concept

Par définition, le rôle d'un système à libération contrôlée est de délivrer la bonne quantité d'un principe actif, au bon endroit et au bon moment (Smith, 1999). En effet, la voie et le mode d'administration, la durée et le site d'action de l'agent sont autant de facteurs à considérer. En fait, la manière d'administrer un principe actif est aussi importante que le principe actif lui-même. Augmenter la sélectivité du site d'action permet d'éviter au principe actif de devoir traverser plusieurs barrières biologiques avant d'arriver à son récepteur. Ces barrières peuvent être la muqueuse intestinale, les protéines plasmatiques, l'élimination par voie lymphatique, l'effet de premier passage hépatique ou encore la barrière hémato-encéphalique (Danckwerts et Fassihi, 1991). D'un point de vue pharmacocinétique, avec une formulation conventionnelle, la molécule est libérée immédiatement entraînant un pic sérique élevé voire toxique. Ensuite, la concentration décline plus ou moins rapidement en fonction du métabolisme de la molécule, ce qui peut donner lieu à une période d'inefficacité jusqu'à l'administration suivante du médicament ou imposer son administration à un rythme inadapté au patient, mettant en péril le suivi et la réussite du traitement (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999). Le seul moyen d'éliminer les pics et les creux des concentrations plasmatiques d'une thérapie conventionnelle, était une perfusion intraveineuse permanente, méthode lourde et onéreuse (Dash et Cudworth, 1998). Par contre, un système à libération contrôlée permet de maintenir la concentration sérique d'un principe actif, incluse dans sa marge thérapeutique, sur une longue période et avec une seule administration (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981). Les nombreux systèmes à libération contrôlée jusqu'à maintenant commercialisés sont administrés essentiellement par voie orale ou transdermique. Mais pour une réelle efficacité dans le traitement à long

terme de plusieurs maladies, l'implantation de systèmes à libération contrôlée devient nécessaire (Park et Park, 1996). L'objectif à ne pas perdre de vue lors de la conception d'un implant à libération contrôlée est d'obtenir un produit suffisamment fiable *in vivo* pour libérer un principe actif à une vitesse connue, sur une durée définie, permettant une fréquence d'administration acceptable pour le patient (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Ranade, 1990).

1.3.1.3. Avantages

Tel que déjà mentionné auparavant, le concept du système à libération contrôlée a pour avantage majeur de maintenir une concentration du principe actif dans la fenêtre thérapeutique en évitant les pics toxiques et les creux inefficaces d'une thérapie conventionnelle (Langer 1990 ; Langer et Peppas, 1981 ; Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998). D'autres avantages plus ou moins directement liés à ce concept en découlent (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Gombotz et Pettit, 1995 ; Jagur-Groddzinski, 1999 ; Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981) :

- o Les concentrations atteintes localement sont plus élevées, augmentant l'efficacité de la thérapie tout en diminuant la quantité de principe actif nécessaire.
- o Les concentrations systémiques ne sont pas élevées inutilement, protégeant ainsi le patient et minimisant le gaspillage du principe actif.
- o Les molécules instables (protéines) et/ou rapidement métabolisées (temps de demi-vie court) sont protégées contre une dégradation précoce.
- o Le suivi clinique est moindre.
- o Le confort du patient au cours du traitement, est amélioré.
- o L'observance thérapeutique est augmentée.

D'une manière générale, l'utilisation d'un système à libération contrôlée en pratique clinique a pour conséquence directe d'augmenter le taux de réussite du traitement tout en diminuant le coût.

1.3.1.4. Inconvénients

Cependant, l'utilisation d'un implant à libération contrôlée n'est pas sans inconvénient (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Langer et Peppas, 1981 ; Ranade, 1990) :

- o Toxicité ou manque de biocompatibilité du matériau utilisé ou des produits de dégradation quand il est biodégradable.
- o Nécessité d'une intervention chirurgicale (caractère invasif) au site d'action pour les formes solides.
- o Douleur occasionnée par la présence de l'implant.
- o Coût élevé de la fabrication du matériau.
- o Risque de perte de contrôle de la libération du principe actif.

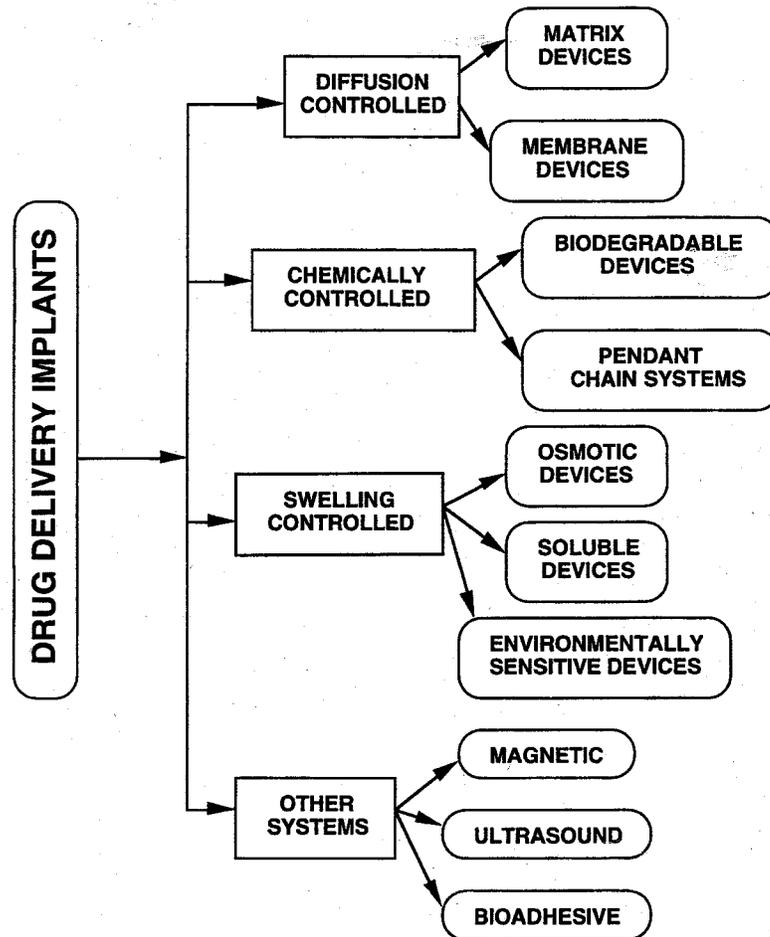
1.3.2. Classification

1.3.2.1. Avant-propos

Il existe de nombreux types de systèmes à libération contrôlée, chacun ayant ses exigences particulières au(x) matériau(x) impliqué(s) (Langer et coll., 1990). Ce phénomène provient notamment des progrès faits à la fois dans la synthèse des matériaux aux propriétés toujours plus performantes et dans la connaissance d'un traitement plus adapté à une pathologie spécifique. Historiquement, les systèmes implantables, utilisés en libération contrôlée, peuvent se classer en deux groupes majeurs (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer, 1990 ; Ranade, 1990) :

- o Les implants à libération contrôlée au sens strict du terme : ils sont en majorité de nature polymère sous forme de matériau plein ou d'une membrane. On peut les répartir en systèmes biodégradables et systèmes non dégradables. Cependant, la classification la plus utile est celle basée sur le mécanisme d'action du contrôle de la libération (Figure 11). Seul ce groupe est abordé dans ce chapitre.
- o Les pompes mécaniques : ces systèmes fonctionnent sous le principe de la différence de pression pour distribuer le principe actif à travers un orifice. Totalement ou partiellement implantables, les pompes sont généralement plus

invasives par leur taille et plus onéreuses par leur complexité de conception que les implants du premier groupe. Par contre elles sont très précises dans le contrôle de la libération, permettent une libération directe dans le compartiment sanguin si nécessaire et sont éventuellement rechargeables. Les pompes ne sont pas abordées dans ce chapitre à l'exception de la pompe osmotique qui peut aussi être classée dans le premier groupe (Figure 11).



(Mallapragada et Narasimhan, 1999)

Figure 11 : Classification des implants à libération contrôlée, basée sur le mécanisme de libération.

Il existe aussi d'autres catégories d'implants, plus marginales (Figure 11). Situés dans une classe intermédiaire, les implants à libération activée sont constitués d'un matériau polymère chargé en principe actif comme dans le premier groupe mais une action extérieure physique est nécessaire pour contrôler la libération de ce principe actif comme dans le cas du deuxième groupe. Cette stimulation peut s'effectuer avec un champ magnétique (Figure 12-H) ou électrique, des ultrasons ou encore une variation de température (Kost et Langer, 1992 ; Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981).

1.3.2.2. Systèmes à libération contrôlée par diffusion

Le contrôle de la libération par diffusion est le mécanisme le plus répandu parmi les systèmes à libération contrôlée (Langer et Peppas, 1981). Le principe actif migre de l'intérieur vers la surface de l'implant puis dans le fluide environnant de l'hôte (Langer, 1990 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999). En général, ces systèmes s'appliquent à des molécules de petite taille (Langer et Peppas, 1981) et ne sont pas biodégradables (Dash et Cudworth, 1998).

1.3.2.2.1. Le système réservoir (à membrane)

Le principe actif compacté est situé au centre du système (noyau), entouré d'une membrane polymère perméable (Figure 12-A) (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981). La diffusion du principe actif s'effectue à travers les chaînes macromoléculaires du polymère quand la membrane est homogène et non poreuse (majorité des cas), ou à travers les pores quand elle est microporeuse (Langer et Peppas, 1981). L'épaisseur et la perméabilité de la membrane contrôlent en partie la vitesse de diffusion du principe actif (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Ranade, 1990).

Ces systèmes ont le grand avantage d'approcher une cinétique de libération d'ordre zéro (transport de type cas II), où la vitesse de diffusion est constante (Langer et

Peppas, 1981). Ceci s'applique notamment à un système réservoir saturé en principe actif afin d'obtenir un équilibre en gradient de concentration entre les interfaces interne et externe de la membrane pendant une certaine période (Dash et Cudworth, 1998 ; Langer et Peppas, 1981 ; Schierholz, 2001).

Par contre, ce système n'est généralement pas biodégradable, nécessitant une seconde chirurgie pour son retrait. Les membranes ne fonctionnent généralement pas pour la libération à long terme de grandes molécules. De plus, ce système est souvent plus onéreux à concevoir que les autres. Enfin, en cas de perte de contrôle comme par exemple une fuite du système par rupture de membrane la situation peut devenir grave parce que toute la quantité de principe actif est subitement libérée dans l'hôte, phénomène communément appelé « dose dumping » (Danckwerts et Fassih, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer et Peppas, 1981).

L'application médicale la plus connue du système réservoir, est Norplant[®] de Wyeth-Ayerst. Il s'agit d'un implant flexible de six tubes de silicone (diamètre : 2.4 mm ; longueur : 34 mm), contenant chacun 36 mg de levonorgestrel, qui, après administration intradermique dans l'avant-bras chez la femme, permet une contraception pour une période de 5 – 6 ans (Dash et Cudworth, 1998 ; Park et Park, 1996 ; Ranade, 1990). D'autres systèmes réservoir avec une membrane d'acétate d'éthylène vinyle, ont été mis au point, notamment par Alza Corporation, comme Ocusert[®] (pilocarpine) pour application locale dans le cul-de-sac conjonctif de la paupière inférieure dans le traitement du glaucome (durée d'activité : 1 semaine) ou comme Progestasert[®] (progestérone) administré par voie utérine comme progestatif (durée d'activité : 1 an) (Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999). Mais finalement, pour des raisons de risque de « dose dumping », le système réservoir est devenu un choix moins populaire dans le domaine de la libération contrôlée (Dash et Cudworth, 1998).

1.3.2.2.2. Le système matriciel (monolithique)

Le principe actif est distribué de manière uniforme à travers la masse polymère solide (Figure 12-B). Comme pour le système réservoir, la diffusion du principe actif à travers le polymère est le facteur limitant (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999). Cette distribution uniforme du principe actif par rapport au polymère est simple de conception, rendant ainsi ce système peu onéreux à fabriquer (Langer et Peppas, 1981).

Par contre, la cinétique de libération obtenue n'est pas d'ordre zéro. Elle est caractéristique d'un mécanisme de dissolution – diffusion où la vitesse de libération diminue avec le temps (Dash et Cudworth, 1998 ; Langer et Peppas, 1981). Plus la concentration initiale de principe actif est élevée, plus sa libération est grande (Dash et Cudworth, 1998). En fait, la quantité de principe actif libérée est proportionnelle à la racine carrée du temps, qui correspond à un transport de type fickien (cas I). La diminution de la vitesse de libération du principe actif en fonction du temps s'explique de la façon suivante (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Langer et Peppas, 1981) :

- o Au début, c'est le principe actif proche de la surface qui est libéré avec une courte distance à parcourir pour sortir.
- o Ensuite, c'est le principe actif en profondeur qui prend plus de temps pour sortir à cause d'un plus long trajet tortueux à accomplir à travers la matrice polymère.

Pour approcher la cinétique d'ordre zéro avec un système matriciel, il faut compenser la distance croissante de diffusion à travers la matrice, par une surface croissante de libération du principe actif (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Langer et Peppas, 1981).

Le système matriciel n'étant pas biodégradable, son utilisation est limitée en médecine humaine par la réticence des patients à subir une seconde chirurgie, même mineure, pour le retrait. Par contre, ce système peu onéreux connaît un succès dans l'utilisation de la libération contrôlée d'hormones chez les animaux de production, chez qui

il n'est nullement nécessaire de retirer l'implant. Compudose[®] de Eli Lilly est un exemple de système matriciel cylindrique à base de silicone contenant de l'œstradiol, autour d'un noyau de polymère inerte. Après implantation sous-cutanée au niveau de l'oreille, ce système prolonge la libération d'œstradiol pendant environ 3 mois par rapport à un implant obtenu par simple compression de l'hormone (Dash et Cudworth, 1998 ; Ranade, 1990). Il en découle une amélioration du taux de croissance et de l'efficacité alimentaire chez les bovins de boucherie (Ranade, 1990).

Une autre application médicale de ces systèmes non dégradables, très répandue en médecine vétérinaire, est le contrôle du cycle de reproduction chez les animaux de production avec la synchronisation de l'œstrus. Jusqu'à maintenant, les deux types de systèmes utilisés sont à base de silicone ou de polyuréthane contenant un progestagène (Einmahl et coll., 2001). On retrouve d'une part les dispositifs vaginaux (éponge, spirale) comme Syncro-Mate[™] (polyuréthane et acétate de fluorogestone), et d'autre part les implants auriculaires comme Hydron[®] (silicone et acétate de fluorogestone).

1.3.2.3. Systèmes à libération contrôlée par réaction chimique

1.3.2.3.1. Le système biodégradable

Tout comme dans le système matriciel, le principe actif est idéalement distribué de façon uniforme au sein du polymère. Cependant, le polymère disparaît avec le temps par le phénomène de dégradation – érosion (Figure 12-C) et le principe actif est libéré. La dégradation peut s'effectuer selon trois mécanismes principaux qui sont le plus souvent combinés ensemble (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Gombotz et Pettit, 1995 ; Langer et Peppas, 1981 ; Orloff et coll., 1997 ; Schierholz, 2001) :

- o Polymères hydrosolubles insolubilisés par des réticulations dégradables (exemple : polysaccharides). Ce mécanisme est très utile pour un principe actif peu hydrosoluble ou macromoléculaire.

- o Polymères non hydrosolubles solubilisés par hydrolyse, ionisation ou protonation des groupements fonctionnels greffés sur les chaînes macromoléculaires. Ce mécanisme est principalement utilisé dans les formes orales et topiques.
- o Polymères non hydrosolubles solubilisés par clivage des chaînes macromoléculaires en petites molécules hydrosolubles (exemples : PLGA, PCL, POE). Ce mécanisme est le plus utile pour l'implantation.

Un système biodégradable a l'avantage majeur d'éviter une seconde chirurgie pour son retrait, augmentant ainsi l'observance thérapeutique (Chandra et Rustgi, 1998 ; Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Gombotz et Pettit, 1995 ; Langer, 1990 ; Langer et Peppas, 1981 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999). Par contre, il existe toujours le risque d'avoir des produits de dégradation toxiques, immunogènes ou carcinogènes (Langer et Peppas, 1981). De plus, le développement d'un système biodégradable est plus compliqué et plus coûteux (Dash et Cudworth, 1998).

Il faut éviter que la dégradation du polymère altère la libération contrôlée. Les polymères biodégradables sont généralement hydrophiles avec une dégradation – érosion de masse additionnelle à celle de surface et de surcroît, le principe actif est libéré par diffusion (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Gombotz et Pettit, 1995 ; Langer et Peppas, 1981 ; Ranade 1990). Pour obtenir une cinétique d'ordre zéro, il faut que la libération du principe actif se fasse uniquement par érosion de surface, avec un implant dont la géométrie permet de conserver cette surface constante dans le temps (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer et Peppas, 1981). La tablette très mince ou la sphère avec un noyau inerte enrobé de principe actif sont deux solutions pour remédier au changement de surface de libération à cause l'érosion (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer et Peppas, 1981). Les POE ont un avenir très prometteur dans ce domaine parce qu'ils sont hydrophobes et s'approchent donc de la situation idéale d'une cinétique d'ordre zéro grâce à une libération du principe actif exclusivement par érosion de surface (Einmahl et coll., 2001 ; Heller et coll., 2000 et 2001).

Un système biodégradable peut aussi être de type réservoir. Il est biodégradable par pur aspect pratique (pas de seconde chirurgie pour le retrait), et il fonctionne suivant un mécanisme de diffusion. De type réservoir ou de type matriciel, la dégradation du matériau doit être suffisamment lente pour laisser le mécanisme de diffusion agir jusqu'à épuisement du principe actif (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998).

Les systèmes biodégradables ont un intérêt particulier dans le traitement du cancer parce que des concentrations élevées de principe actif toxique sont nécessaires localement (Dash et Cudworth, 1998 ; Heller et coll., 2000). Un implant PLGA (diamètre : 1mm ; longueur : 3 – 6 mm) contenant un agoniste de LHRH, a été commercialisé sous le nom de Zoladex[®] par Astra Zeneca pour le traitement du cancer de la prostate (Gombotz et Pettit, 1995 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999). Le traitement de la douleur notamment dans le cas du cancer et de l'arthrite, est devenu une autre application biomédicale intéressante pour les systèmes biodégradables (Dash et Cudworth, 1998).

En médecine vétérinaire, des microsphères PLA contenant de la progestérone et de l'œstradiol ont été développées sous forme de produit injectable par voie intramusculaire (Lutamate Plus[™]) pour une libération de 12 – 14 jours dans le but de contrôler l'ovulation chez la jument (Einmahl et coll., 2001).

1.3.2.3.2. Le système à chaînes polymères greffées

Le principe actif est greffé à la chaîne polymère par liaison chimique, pour en être libéré par clivage hydrolytique ou enzymatique (Figure 12-D). Les chaînes polymères solubles sont plus utilisées dans les formes de ciblage de cellules, alors que les insolubles le sont dans les formes à libération contrôlée à long terme. La chaîne polymère peut être biodégradable ou non (Langer et Peppas, 1981). Dans ce cas, on peut attribuer le terme de pro-médicament au principe actif fixé qui devient actif lorsqu'il est libéré du polymère (Jagur-Grodzinski, 1999).

L'atout majeur d'un système à chaînes polymères greffées est sa capacité d'accepter une charge élevée en principe actif (80 %) quand la solubilité de ce dernier le permet. Cette caractéristique est intéressante avec un polymère coûteux dont la proportion est habituellement de 70 – 90 % dans les autres types de systèmes (Langer et Peppas, 1981).

Le risque d'un tel système est une réaction d'hypersensibilité parce que le principe actif couplé à la chaîne polymère peut être perçu comme un haptène, alors que ni le polymère, ni le principe actif seul ne causent de complications (Langer et Peppas, 1981).

1.3.2.4. Systèmes à libération contrôlée par activation par le solvant

L'exposition de ces systèmes à un solvant, déclenche la libération du principe actif (Langer, 1990).

1.3.2.4.1. Le système à gonflement

Le principe actif est dissous ou dispersé au sein de la matrice polymère sans être capable d'en sortir. Avec l'entrée du solvant, le polymère solide à l'état vitreux, gonfle. La température de transition vitreuse diminuant, le polymère passe à l'état caoutchouteux pour ressembler à un gel. Il se crée ainsi un front de séparation gel – solide qui progresse vers le centre du système (Figure 12-E). Avec la relaxation macromoléculaire associée à la transition à l'état caoutchouteux, le principe actif est alors capable de diffuser vers l'extérieur (Dittgen et coll., 1997 ; Langer et Peppas, 1981). Le système à gonflement est particulièrement intéressant pour la libération de protéines parce qu'il est le seul type à laisser diffuser ces molécules de masse molaire élevée, grâce aux canaux de fluide présents dans la matrice à l'état de gel (Gombotz et Pettit, 1995). Le système à gonflement typique est l'hydrogel, polymère très hydrophile, qui absorbe le solvant en grande quantité. Methocel[®] (dérivé de cellulose) de Dow Chemical ou Eudragit[®] (polymère acrylique) de Röhm Pharma (Dash et Cudworth, 1998 ; Mallapragada et Narasimhan, 1999) sont des exemples d'hydrogels.

La diffusion du principe actif dans la phase caoutchouteuse est généralement de type fickien lorsque le système a atteint son équilibre de gonflement (gonflement limité). Cependant, si cet équilibre n'est pas atteint (gonflement continu), la diffusion est de type anomal, voire même de type cas II (cinétique d'ordre zéro) quand le front de séparation avance à une vitesse constante (Langer et Peppas, 1981). Quel que soit le type de diffusion, la vitesse de libération du principe actif est proportionnelle à celle de la pénétration du solvant dans la matrice polymère (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998).

À la différence des systèmes de libération contrôlée par diffusion, le système à gonflement a l'avantage de donner un type de libération indépendant des propriétés du principe actif. Il n'est pas nécessaire ainsi, d'établir une nouvelle formulation pour un principe actif ayant des propriétés différentes (Langer et Peppas, 1981). Le système à gonflement peut tout de même être considéré comme un système matriciel particulier (Schierholz, 2001).

Comme variante en infiltrant le polymère, le solvant peut provoquer, sous l'action de la pression osmotique, l'ouverture de pores par où s'échappe le principe actif (Figure 12-F) (Langer, 1990).

1.3.2.4.2. Le système à pression osmotique (pompe osmotique)

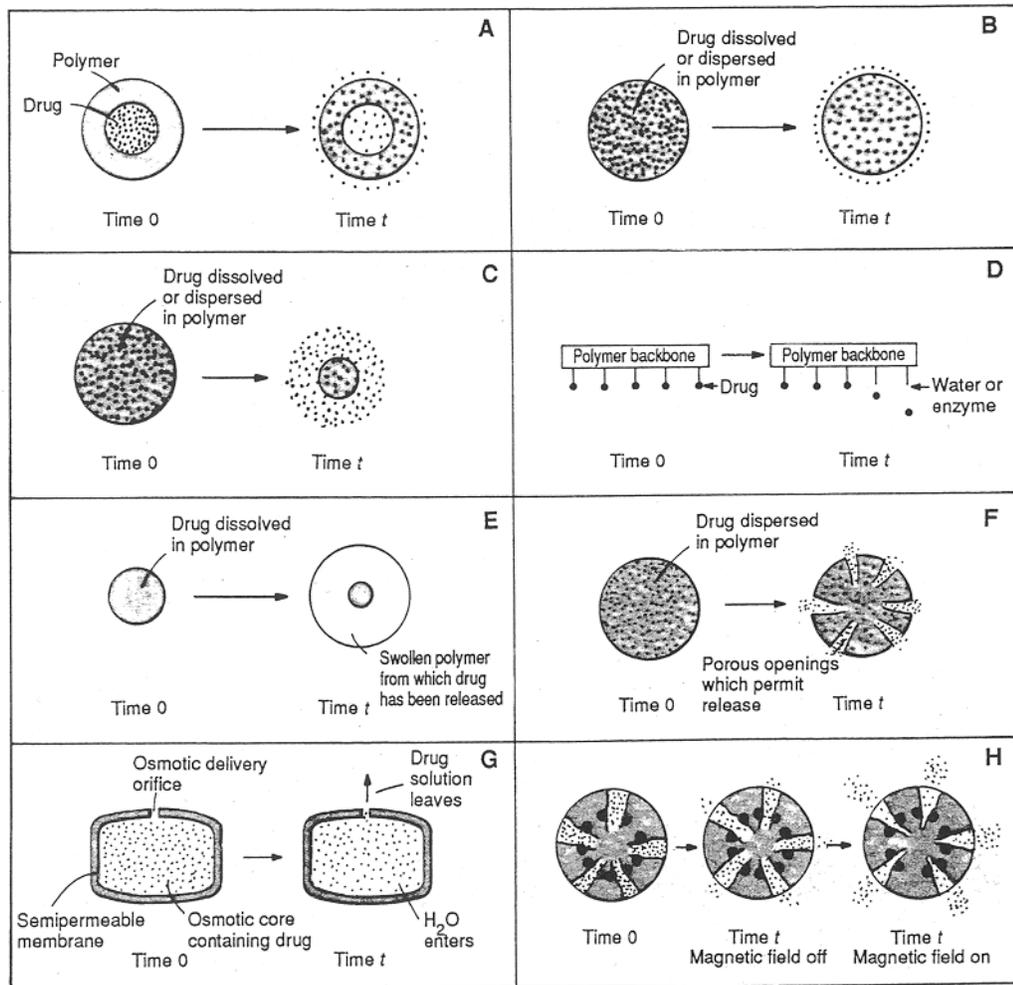
Ce système porte le nom de pompe osmotique parce qu'il utilise la pression osmotique comme force mécanique pour libérer un principe actif (Verma et coll., 2002). Développée par Alza Corporation, la pompe osmotique est un système réservoir avec une membrane d'une part semi-perméable qui ne laisse que rentrer le solvant et d'autre part dotée d'un micro-orifice par lequel est expulsé le principe actif dissous (Figure 12-G) (Dash et Cudworth, 1998 ; Langer, 1990 ; Verma et coll., 2002). La pompe osmotique peut être considérée comme un cas particulier de système réservoir (Schierholz, 2001).

Ce système permet une libération constante du principe actif avec une cinétique d'ordre zéro (type cas II) jusqu'à la fin de la libération (Danckwerts et Fassihi, 1991 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Langer, 1990 ; Ranade, 1990). Les facteurs qui déterminent la vitesse de libération avec une pompe osmotique sont la solubilité du principe actif, la pression osmotique de la formulation dans le réservoir, l'orifice de sortie et les propriétés de la membrane semi-perméable. L'eau pénètre dans la pompe à une vitesse bien déterminée qui dépend essentiellement de la perméabilité de la membrane et de la pression osmotique dans le réservoir (Verma et coll., 2002). Il se forme alors une solution saturée de principe actif qui est libérée à une vitesse contrôlée en partie par la taille de l'orifice. Environ 60 à 80 % de la quantité totale du principe actif est libéré à une vitesse constante. En effet, dans la plupart des cas, une période de 30 à 60 minutes est observée avant d'atteindre une cinétique de libération d'ordre zéro. Cette période correspond au temps nécessaire pour l'hydratation de la pompe osmotique (Verma et coll., 2002). La pompe osmotique a aussi l'avantage d'éviter l'effet de décharge initiale, observé avec les autres systèmes (Dash et Cudworth, 1998) et elle fonctionne notamment avec des molécules moyennement hydrosolubles (Verma et coll., 2002).

Telle que décrite précédemment, cette technologie a été commercialisée par Alza Corporation pour une utilisation par voie orale sous l'appellation OROS[®] (Alza Corporation, données internes ; Verma et coll., 2002). La première pompe osmotique orale a été développée il y a 25 ans et depuis, de nombreuses variantes ont été mises au point ultérieurement pour répondre à la demande dans le domaine de la libération contrôlée (Verma et coll., 2002). Par exemple, OROS[®] Push-Pull[™] System a été développé pour la libération de molécules fortement ou faiblement hydrosolubles (Alza Corporation, données internes ; Verma et coll., 2002).

Un implant basé sous le principe de la pompe osmotique a aussi été mis au point par Alza Corporation sous le nom commercial de DUROS[®] pour permettre une libération continue et constante sur une durée d'un mois à un an (Alza Corporation, données internes ;

Verma et coll., 2002). Cette pompe osmotique miniature est constituée d'un cylindre creux en titane pour protéger l'agent thérapeutique préalablement placé dans un compartiment. Après implantation, l'eau des tissus pénètre par une extrémité à travers une membrane semi-perméable dans une chambre osmotique qui se met à gonfler pour pousser un petit piston en direction du compartiment contenant le principe actif. Ce dernier sort à travers un orifice à l'autre extrémité du cylindre, sous la pression du piston. La longueur du cylindre dépend des besoins thérapeutiques selon la quantité d'agent et la durée d'action nécessaires (Alza Corporation, données internes). Une première application approuvée de cette technologie est l'implant Viadur™, commercialisé récemment aux États Unis par Bayer. Après implantation sous-cutanée dans l'avant-bras chez l'Homme, Viadur™ (longueur : 44 mm ; diamètre : 4 mm) permet la libération systémique d'un peptide (leuprolide) sur une période d'un an pour le traitement palliatif du cancer avancé de la prostate (Alza Corporation, données internes ; Verma et coll., 2002). La technologie DUROS® est encore en cours de développement pour le contrôle de la douleur (arthrite, cancer) avec du sufentanil (libération systémique sur 3 mois) et de l'hydromorphone (libération localisée à la moelle épinière) (Verma et coll., 2002). La technologie de la mini-pompe osmotique implantable a aussi été développée pour usage vétérinaire. Ce système peut être implanté en région sous-cutanée ou intra-péritonéale chez différentes espèces animales permettant la libération d'un agent incluant peptides et protéines sur une période d'un jour à un an (Verma et coll., 2002).



(Langer, 1990a)

Figure 12 : Mécanismes de contrôle de la libération d'un principe actif par 1) diffusion avec le système réservoir (A) et le système matriciel (B), 2) réaction chimique avec le système biodégradable (C) et le système à chaînes polymères greffées (D), 3) activation par le solvant avec le système à gonflement (E et F) et la pompe osmotique (G) et 4) action mécanique extérieure (H).

1.3.2.5. Conclusion

Pour un même système, plusieurs mécanismes de libération peuvent intervenir simultanément (Langer, 1990). Dans un système biodégradable par exemple, le principe actif est aussi libéré par diffusion avec la pénétration du solvant qui peut en plus induire un gonflement du polymère (Langer et Peppas, 1981).

La sélection du biomatériau et la conception de la formulation avec le principe actif sont des étapes critiques pour le bon fonctionnement d'un système à libération contrôlée. Un biomatériau se caractérise par la vitesse de diffusion du principe actif à travers lui, sa vitesse d'érosion, la vitesse de pénétration du solvant, autant de facteurs qui interviennent respectivement dans les systèmes à libération contrôlée par diffusion, par réaction chimique et par activation par le solvant (Langer et Peppas, 1981 ; Pulapura et Kohn, 1992).

Parmi les différentes utilisations d'implants, la libération contrôlée d'un principe actif est celle qui connaît le plus grand essor. Le succès croissant de ces systèmes à libération contrôlée est causé par des raisons purement économiques. D'une part, les tendances politiques actuelles cherchent à diminuer les coûts de la santé publique en raccourcissant les temps de séjour des patients à l'hôpital (Ranade, 1990). D'autre part, le coût de la recherche pour ces systèmes et le temps nécessaire pour les développer sont tous deux relativement faibles (20 – 50 millions \$ US et 3 – 4 ans) par rapport ceux de la découverte d'un nouveau principe actif (500 millions \$ US et 10 – 12 ans). De surcroît, les systèmes à libération contrôlée apportent un second souffle aux agents thérapeutiques, en augmentant leur valeur marchande, leur compétitivité et leur durée de vie (Verma et coll., 2002). Parmi les différentes applications des implants à libération contrôlée, le domaine le plus prometteur est certainement celui du traitement anticancéreux. Cependant, il ne faut pas négliger le contrôle de la douleur et l'antibiothérapie loco-régionale (Ranade, 1990).

1.3.3. Application en antibiothérapie loco-régionale

1.3.3.1. Pertinence

Outre les considérations de biocompatibilité, un implant à libération contrôlée d'antibiotique doit permettre une libération constante à des concentrations efficaces pour éviter tout risque de développement de résistance microbienne. Il existe des pompes mécaniques qui permettent une perfusion continue mais le réservoir doit être régulièrement rempli et le dispositif retiré à la fin du traitement s'il est implanté (Streppa et coll., 2001). Deux catégories d'implants sont disponibles : les non dégradables et les biodégradables. On retrouve parmi eux, des systèmes réservoir et des systèmes matriciels. Les implants matriciels se caractérisent par une phase initiale rapide de libération de l'antibiotique, suivie d'une phase lente stable alors que les implants réservoir permettent mieux de garder une libération constante. Cependant, le danger du « dose dumping » persiste avec ces derniers (Streppa et coll., 2001).

L'avantage d'un tel système est de cibler la libération d'antibiotique localement à des concentrations très élevées qu'on ne peut obtenir par administration systémique orale et/ou parentérale conventionnelle sans risque de toxicité systémique (Dash et Cudworth, 1998 ; Gray, 1995 ; Jain et Panchagnula, 2000 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Rushton, 1997 ; Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996). Ces concentrations locales sont largement supérieures aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la plupart des micro-organismes habituellement responsables de l'ostéomyélite (Dash et Cudworth, 1998). L'implant idéal doit libérer l'antibiotique de manière à être initialement bactéricide et ensuite maintenir un niveau bactériostatique jusqu'à ce que le tissu soit suffisamment guéri pour que le système immunitaire de l'hôte élimine les bactéries résiduelles (Calhoun et Mader, 1989).

En médecine vétérinaire, l'utilisation d'un implant à libération contrôlée d'antibiotique est d'autant plus justifié pour assurer une meilleure observance thérapeutique, notamment avec des animaux difficiles à traiter, et pour éviter un traitement systémique à long terme trop onéreux (Tobias et coll., 1996).

1.3.3.2. L'ostéomyélite : un adversaire redoutable

De nos jours, les fractures ouvertes sévères chez l'Homme sont de nature commune à cause du mode de vie dans notre société qui nous prédispose aux accidents comme par exemple les moyens de transport rapides. Le développement d'ostéomyélite avec ces fractures se produit dans 10 à 15 % des cas (Jain et Panchagnula, 2000).

Chez les animaux, la grande majorité des infections orthopédiques et des tissus mous sont d'origine post-traumatique, que ce soit chirurgical ou accidentel (Dernell, 1999 ; Johnson, 1994). En effet, si l'ostéomyélite d'origine hématogène est diagnostiquée dans 19 % des cas chez l'Homme, elle est rare chez le chien avec une prévalence inférieure à 10 % (Dernell, 1999 ; Johnson, 1994). La contamination bactérienne étant le facteur déclenchant, l'ostéomyélite post-traumatique est favorisée lors d'un traumatisme sévère, avec la présence d'un corps étranger comme un fragment osseux avasculaire ou un implant orthopédique (Dernell, 1999 ; Johnson, 1994).

Chez l'Homme, les deux tiers des infections osseuses en présence d'une prothèse sont polymicrobiennes avec une dominance de *S. epidermidis* quand un matériau polymère est présent (Gray, 1995). La bactérie la plus fréquemment associée à l'ostéomyélite est *S. aureus* (Gray, 1995 ; Mader et coll., 1993) mais on retrouve aussi régulièrement des entérobactéries Gram-négatives, notamment *Enterobacter* spp. et *Pseudomonas* spp. (Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Mader et coll., 1993).

Chez le chien, l'ostéomyélite est majoritairement mono-bactérienne et l'agent pathogène le plus incriminé est *Staphylococcus* spp., suivi de *Streptococcus* spp.

(Dernell, 1999 ; Johnson, 1994). De plus, chez le chien et le chat, l'ostéomyélite peut se développer à la suite d'une morsure profonde qui inocule des bactéries anaérobies de la cavité buccale de ces carnivores (Johnson, 1994).

Avec la présence d'un corps étranger comme un implant, surviennent d'une part le problème d'adhérence des agents pathogènes à la surface du matériau qui favorise le développement d'une infection (Petty et coll., 1985), et d'autre part le risque de la formation d'un biofilm rendant extrêmement difficile l'éradication des bactéries (voir chapitre précédent).

Le traitement traditionnel est un débridement chirurgical avec curetage de l'os infecté, retrait des débris nécrotiques et de l'implant infecté si possible, drainage de la plaie et stabilisation du site de fracture. De plus, un traitement antibiotique à long terme (4 à 7 semaines), est mis en place par voie systémique après la chirurgie pour arrêter le développement de l'infection (Cierny et Mader, 1987 ; Dernell, 1999 ; Jain et Panchagnula, 2000 ; Johnson, 1994 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Mader et coll., 1993 et 1997 ; Streppa et coll., 2001). Cependant, toutes ces précautions peuvent ne pas être suffisantes à cause d'une faible perfusion du tissu osseux qui ne permet pas une pénétration suffisante et assez rapide de l'antibiotique (Dernell, 1999 ; Jain et Panchagnula, 2000). L'ostéomyélite, notamment chronique, est alors difficile à traiter parce qu'elle est souvent associée à une perfusion vasculaire locale encore plus faible à cause de la nécrose et de l'infection des tissus osseux et avoisinants (Dernell, 1999 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000).

1.3.3.3. Le système non dégradable de référence : le PMMA

L'idée d'utiliser un ciment osseux de PMMA imprégné d'un antibiotique pour permettre une libération contrôlée locale, a été décrite pour la première fois il y a 30 ans (Buchholz et Engelbrecht., 1970). Ce fut aussi la première utilisation du PMMA en tant que système à libération contrôlée (Dittgen et coll., 1997).

À partir de ce concept, un produit a été commercialisé en Europe par la compagnie pharmaceutique allemande E Merck KGaA sous le nom de Septopal[®] à partir de 1977 (Gray, 1995 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Walenkamp et coll., 1986). Depuis, ce produit a été utilisé dans le traitement des plaies contaminées, des fractures ouvertes, des ostéomyélites chroniques, des arthroplasties totales infectées et des infections des tissus mous de l'abdomen, du rectum et du cou (Blaha et coll., 1993 ; Calhoun et Mader, 1989 ; Classen, 1996 ; Gray, 1995 ; Henry et coll., 1993a et 1993b ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Nelson et coll., 1994 ; Walenkamp et coll., 1986). Il est aussi employé en antibioprophylaxie pour les chirurgies de remplacement total de hanche ou du genou (Calhoun et Mader, 1989 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000). Le Septopal[®] est formé de billes de PMMA (7 mm de diamètre) organisées en chapelet (10, 30 ou 60 billes), contenant chacune 7.5 mg de sulfate de gentamicine distribué de façon homogène (Brown et Bennett, 1988 ; Walenkamp et coll., 1986).

La libération de l'antibiotique est bimodale. Une libération rapide et massive a lieu pendant les premières 24 heures qui suivent l'implantation, correspondant à la diffusion de l'antibiotique en surface. Ensuite la libération s'effectue à une vitesse plus lente et constante pendant une à plusieurs semaines en fonction du coefficient de diffusion de l'antibiotique à l'intérieur de l'implant (Calhoun et Mader, 1989 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Picknell et coll., 1977 ; Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996). Après implantation dans le tibia du chien, le PMMA imprégné de tobramycine,

vancomycine ou clindamycine a montré de bonnes propriétés de libération de ces 3 antibiotiques avec des concentrations élevées dans l'os et le tissu de granulation (Adams et coll., 1992). Par contre, le PMMA imprégné de céfazoline ou de ciprofloxacine n'a donné des concentrations locales efficaces seulement pendant 2 semaines (Adams et coll., 1992). Chez l'Homme (Calhoun et Mader, 1989 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Nelson et coll., 1994) tout comme chez l'animal (Dernell, 1999 ; Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996), les antibiotiques les plus utilisés avec le PMMA restent la gentamicine et la tobramycine.

La vitesse et la durée de libération dépendent aussi de la marque du PMMA utilisé (Calhoun et Mader, 1989 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996). En effet, ces différentes marques se différencient par leur porosité et leur perméabilité, paramètres importants dans la vitesse de libération par diffusion. Cependant, des données contradictoires ont été rapportées concernant la détermination de la marque de PMMA qui apporte le meilleur profil de libération d'antibiotique (Streppa et coll., 2001). Le Palacos[®] semble plus approprié à la libération d'aminoglycosides (gentamicine et tobramycine) et le Simplex[®] à celle des pénicillines β -lactames respectivement (Calhoun et Mader, 1989 ; Flick et coll., 1987 ; Streppa et coll., 2001 ; Von Fraunhofer et coll., 1985).

Outre les types de PMMA et d'antibiotique utilisés, la vitesse de diffusion est aussi fonction de la concentration initiale (charge antibiotique), de la taille, forme et surface de contact de l'implant et de la quantité de fluide d'irrigation (Calhoun et Mader, 1989 ; Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996).

Par contre, le PMMA n'est pas dégradable et une seconde chirurgie est requise pour son retrait (Calhoun et Mader, 1989 ; Dash et Cudworth, 1998 ; Rushton, 1997 ; Streppa et coll., 2001), généralement entre 2 et 4 semaines après l'implantation (Gray, 1995 ; Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000). Cette seconde intervention nécessite

une anesthésie parce que trop douloureuse (Calhoun et Mader, 1989). Les tissus mous locaux peuvent être endommagés lors du retrait de l'implant et ce dernier peut même être difficile à enlever à cause de la croissance du tissu fibreux tout autour (Brown et Bennet, 1988 ; Gray, 1995 ; Rushton, 1997 ; Tobias et coll., 1996). Souvent une étape de reconstitution osseuse du site est nécessaire lors de cette seconde intervention (Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000). L'implant PMMA, notamment sous forme de billes, a tendance à rétrécir et il faut absolument le retirer avant que la croissance osseuse ne démarre sinon le retrait devient impossible parce que trop traumatique (Jain et Panchagnula, 2000). Cependant les avantages apportés par ce mode de thérapie contrebalancent ces inconvénients (Gray, 1995).

L'étape de polymérisation dans la fabrication du PMMA est une réaction exothermique. Le développement d'un implant PMMA pour l'antibiothérapie loco-régionale se limite aux antibiotiques stables jusqu'à 100 °C (Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996). En plus d'être bactéricides et efficaces contre les agents pathogènes communément rencontrés en chirurgie, les aminoglycosides sont thermostables. C'est pourquoi, ils ont souvent été utilisés avec le PMMA. Cependant, l'implant PMMA s'est avéré être aussi fonctionnel avec d'autres familles d'antibactériens, comme notamment les céphalosporines, et éventuellement les quinolones (Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Streppa et coll., 2001).

Malgré ses inconvénients, l'implant PMMA chargé en gentamicine est pratiquement la seule solution actuellement disponible dans le cadre d'une antibiothérapie loco-régionale en médecine vétérinaire (Brown et Bennet, 1988 ; Dernell, 1999 ; Marcoux et Bouré, 1998 ; Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996). Expérimentalement, de nombreuses études ont été effectuées chez différentes espèces animales (Calhoun et Mader, 1989). Cliniquement, les implants PMMA chargés en antibiotique sont utilisés chez le chien, notamment en antibioprofylaxie lors d'une arthroplastie totale de la hanche

(Dernell, 1999 ; Tobias et coll., 1996). Ils sont aussi employés à l'occasion, lors d'arthrites septiques et autres infections orthopédiques chez le chien et le cheval (Dernell, 1999 ; Marcoux et Bouré, 1998 ; Tobias et coll., 1996).

1.3.3.4. Les systèmes dégradables

Pour parer à l'inconvénient majeur d'une seconde intervention parfois traumatique pour le retrait des implants PMMA, de nombreux systèmes biodégradables ont été testés dans le cadre d'une utilisation en antibiothérapie loco-régionale.

Le PLGA est un excellent candidat pour remplacer le PMMA parce qu'il est capable de libérer un antibiotique au cours de sa dégradation. En effet, ce polymère a montré une efficacité dans le traitement local de l'ostéomyélite expérimentale chez l'animal, lorsqu'il contient de la gentamicine (Garvin et coll. 1994), de l'ampicilline (Jacob et coll., 1991), de la vancomycine (Calhoun et Mader, 1997), de la céfazoline (Jacob et coll., 1997), de l'ofloxacine (Nie et coll., 1998) ou de la pefloxacine (Kanellakopoulou et coll., 2000). De plus, le PLGA libère la ciprofloxacine *in vitro* et *in vivo* (intra-osseux) à des concentrations locales efficaces pendant une période maximale d'un mois (Andreopoulos et coll., 1996 ; Overbeck et coll., 1995 ; Ramchandani et Robinson, 1998). Par contre, la biodégradation de ce matériau est rapide, ce qui le limite à une utilisation temporaire notamment quand une fonction de support est recherchée dans une réduction de fracture (Jain et Panchagula, 2000 ; Streppa et coll., 2001).

Des éponges en collagène imprégnées de gentamicine sont commercialement disponibles en Europe depuis une dizaine d'année (Rushton, 1997). Cependant, la libération de l'antibiotique est parfois trop rapide, limitant ainsi la durée d'efficacité de l'implant. De surcroît, il existe toujours un risque de réaction immunitaire puisque le collagène est d'origine animale (Kanellakopoulou et Giamarellos-Bourboulis, 2000 ; Streppa et coll., 2001).

Des implants en céramique (matériaux minéraux) ont été développés pour pouvoir assurer un rôle simultané de support dans la reconstruction osseuse. Les ciments de HAP et de phosphate tricalcique ont permis des libérations constantes de céphalexine et norfloxacin, et d'érythromycine et pénicilline respectivement, à des niveaux thérapeutiques et tout en accélérant la régénération osseuse (Dash et Cudworth, 1998 ; Streppa et coll., 2001). Récemment chez l'Homme, avec une libération intra-osseuse de 90 % de sa charge sur 3 mois, le HAP imprégné de vancomycine s'est montré efficace pour le traitement de l'ostéomyélite causée par un *S. aureus* résistant à la méthicilline (Saito et coll., 2002). Le HAP est reconnu pour son excellente compatibilité et son affinité avec le tissu osseux. En effet, sa composition chimique élémentaire est identique à celle de l'os et c'est par conséquent un bon matériau pour une utilisation à long terme (Jain et Panchagula, 2000 ; Streppa et coll., 2001). Grâce à la porosité du HAP, le tissu de régénération osseuse en croissance (ostéconduction) peut pénétrer dans le matériau qui se dégrade ensuite, ce qui permet de maintenir une bonne stabilité de l'implant en évitant la formation de tout espace mort (Streppa et coll., 2001). Cependant, la fragilité de cette céramique limite son utilisation comme implant orthopédique dans les situations de compression mécanique élevée (Jain et Panchagula, 2000). Un HAP d'origine corallienne a été commercialisé sous le nom de Pro Osteon[®] par Interpore International of Irvine, seule compagnie approuvée par la FDA pour la fabrication d'un matériau de comblement osseux synthétique (Jain et Panchagula, 2000).

Le plâtre de Paris (gypse) est un sulfate de calcium hydraté qui a été utilisé en tant que système à libération contrôlée d'un antibiotique en chirurgie orthopédique parce qu'il peut jouer un rôle de support mécanique et il n'inhibe pas la croissance osseuse. Les propriétés de diffusion dépendent de l'antibiotique utilisé, et une libération lente (> 50 jours) a été obtenue avec la gentamicine et la fucidine (Mackey et coll., 1982). Malheureusement, la biodégradation du plâtre de Paris est lente (plusieurs mois) et peut altérer la réparation osseuse (Streppa et coll., 2001).

1.3.3.5. Conclusion

Malgré le grand bénéfice apporté par une antibiothérapie loco-régionale, il ne faut pas négliger les règles chirurgicales de base d'asepsie, ni le traitement conventionnel du débridement des plaies contaminées ou même l'antibiothérapie systémique quand elle s'y prête (Streppa et coll., 2001 ; Tobias et coll., 1996). Bien qu'il n'existe aucun critère absolu pour appliquer ou non l'antibiothérapie loco-régionale à l'aide d'implants, un clinicien devrait considérer cette option lors de sévères infections locales aiguës et lors des profondes infections chroniques qui résistent aux traitements chirurgical et médical traditionnels (Streppa et coll., 2001).

Par ailleurs, la recherche en matière de libération contrôlée au niveau osseux n'est pas exhaustive, surtout si on la compare à celle dans d'autres applications biomédicales. Beaucoup reste à faire pour développer des ciments osseux de plus en plus performants dans le traitement local non seulement d'une infection mais aussi d'un cancer ou de maladies métaboliques osseuses (Jain et Panchagnula, 2000).

1.3.4. L'amidon en libération contrôlée

Les polysaccharides font partie des polymères utilisés en libération contrôlée d'un principe actif. Généralement caractérisés par des propriétés de gonflement, ils se situent dans la catégorie des hydrogels (Gombotz et Pettit, 1995). Celluloses, chitines et chitosans, cyclodextrines et dextrans, alginates et amidons sont les polysaccharides les plus intéressants pour des applications biomédicales (Chandra et Rustgi, 1998 ; Gombotz et Pettit, 1995 ; Gombotz et Wee, 1998 ; Hirayama et Uekama, 1999).

1.3.4.1. Composition

L'amidon est la forme de réserve glucidique des végétaux. C'est essentiellement un homopolymère de molécules de D-glucose (98 – 99 %) qui sont liées par des liaisons de type α -(1,4) majoritairement (95 – 96 %), et de type α -(1,6) plus rarement (4 – 5 %) (Buléon et coll., 1990). L'amidon est composé d'un mélange de deux polymères distincts (Buléon et coll., 1990 ; Weil, 1990) :

- o L'amylose est un polymère essentiellement linéaire constitué d'unités de D-glucose liées par des liaisons de type α -(1,4). L'amylose contient en moyenne 500 à 6 000 unités glucosyl, réparties en plusieurs chaînes de longueurs variables. La masse molaire de l'amylose varie de 150 000 à 600 000.
- o L'amylopectine est un polymère formé de chaînes principales identiques à celles de l'amylose avec des liaisons glucosidiques de type α -(1,4). Des chaînes latérales de la même structure viennent s'attacher sur la chaîne principale par des liaisons de type α -(1,6). L'amylopectine est caractérisée par des masses molaires très élevées de $10^7 - 10^8$.

Les différents types d'amidons conventionnels utilisés en industrie, contiennent généralement 30 % d'amylose (de 17 à 35 %) et 70 % d'amylopectine (de 70 à 80 %) (Jane et coll., 1992 ; Le Bail et coll., 1999 ; Buléon et coll., 1990 ; Ravenelle et coll., 2002).

1.3.4.2. Utilisation en libération contrôlée

1.3.4.2.1. Libération *in vitro*

Il a été observé que les microparticules d'amidon ont la capacité de libérer du lysozyme, de l'albumine sérique, de l'anhydrase carbonique ou de l'immunoglobuline G sur une période de 9 semaines et plus. La vitesse de libération est inversement proportionnelle à la masse molaire de la protéine incorporée dans la microsphère (Artursson et coll., 1984a). En accord avec ces observations, il a été démontré que des microsphères d'amidon réticulé avec du chlorure de calcium, ont un mécanisme de libération en fonction

de la taille de la molécule à libérer (Kost et Shefer, 1990). Les molécules de faible masse molaire ont été libérées principalement par diffusion alors que celles de masse molaire élevée, ont été libérées plus lentement et en parallèle avec la dégradation du polymère polysaccharidique.

Par ailleurs, le temps de libération de l'insuline contenue dans les microsphères d'amidon réticulé à l'épichlorhydrine, variait de 10 à 60 minutes quand leur facteur de gonflement augmentait (Björk et Edman, 1990). Par contre, la méthode d'incorporation du principe actif dans les microsphères d'amidon est cruciale. Avec la même charge d'une même molécule, il a été démontré qu'elles peuvent tout libérer en 5 minutes ou ne rien libérer pendant 4 heures (Illum et coll., 1987).

1.3.4.2.2. Libération in vivo

Plusieurs études ont été accomplies avec des microsphères d'amidon administrées par voie nasale en tant que système à libération contrôlée de petites molécules polaires et de peptides et protéines. Chez le mouton, il a été démontré que ces microsphères d'amidon augmentent de 10 fois la biodisponibilité de la gentamicine (Illum et coll., 1988) et de 5 fois l'absorption nasale de l'insuline (Farraj et coll., 1990) par rapport à une solution normale par voie nasale. Chez le rat, la biodisponibilité de l'insuline par voie nasale, a été augmentée de 30 fois lorsqu'administrée avec des microsphères d'amidon (Björk et Edman, 1988 et 1990). Chez le lapin, la biodisponibilité de l'insuline administrée par voie nasale avec les microsphères, a été davantage améliorée quand l'amidon était mélangé avec 5 à 10 % de polymère d'acide acrylique (Callens et Remon, 2000).

Ainsi, avec des propriétés adéquates de bioadhésion et de gonflement, il a été démontré que les microsphères d'amidon ont la capacité de contrôler la libération d'un principe actif et d'en augmenter la biodisponibilité par voie nasale, tout en protégeant ce principe actif contre la dégradation enzymatique et l'élimination mécanique par le milieu

nasal. Le mécanisme d'action est expliqué comme suit (Björk et Edman, 1988 et 1990 ; Björk et coll., 1991 et 1995 ; Edman et coll., 1992 ; Illum et coll., 2001) :

- o La microsphère se dépose sur la portion antérieure de la cavité nasale où très peu ou aucun cil n'est présent. La microsphère se présente alors progressivement aux régions d'absorption de la muqueuse nasale.
- o La formulation contenant le principe actif est maintenue longtemps au contact de la muqueuse grâce à la propriété de bioadhésion de la microsphère qui se gélifie.
- o La microsphère maintient localement une concentration élevée du principe actif au contact de la muqueuse.
- o La gélification de la microsphère se fait au dépend du mucus à la surface de la muqueuse qui se retrouve asséchée. Les jonctions entre les cellules de la muqueuse sont ainsi dilatées et l'entrée du principe actif par la voie paracellulaire est augmentée.

Ce mécanisme a aussi été démontré *in vitro* avec la muqueuse intestinale, élargissant ainsi les applications possibles des microsphères d'amidon (Björk et coll., 1995).

Chez la souris et le rat, des microsphères d'amidon contenant de la dextranase, ont été injectées par voie intraveineuse afin de faire libérer cette enzyme dans le système réticulo-endothélial après phagocytose par les macrophages (Artursson et coll., 1984b). En plus de permettre une protection de l'enzyme jusqu'à son arrivée dans le compartiment lysosomal, les microsphères d'amidon ont joué un rôle de ciblage pour libérer l'enzyme.

1.3.4.3. Contramid[®] : un amidon réticulé à teneur élevée en amylose

1.3.4.3.1. Définition

La dénomination actuelle du Contramid[®] est hydroxypropyl amidon réticulé à teneur élevée en amylose. Le Contramid[®] est le produit final d'un amidon modifié par traitement chimique, ayant initialement une forte teneur en amylose (70 %). L'amidon

(Hylon VII, National Chemical Starch ; CIAmyloGel 03003, Cerestar) à l'état granulaire, subit une gélatinisation en milieu basique, une réticulation et une hydroxypropylation. Ensuite, un séchage par vaporisation permet d'obtenir le Contramid[®] en poudre, prêt à l'utilisation sous forme d'excipient pour les systèmes à libération contrôlée (Labopharm, données internes).

La réticulation se produit entre deux chaînes d'amylopectine ou d'amylose ou encore entre une chaîne d'amylopectine et une chaîne d'amylose (Labopharm, données internes). La réticulation de l'amidon et/ou de l'amylose peut être accomplie avec l'épichlorhydrine (Dumoulin et coll., 1994 ; Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Jane et coll., 1992 ; Lenaerts et coll., 1991, 1992 et 1998 ; Moussa et Cartilier, 1996 et 1997 ; Moussa et coll., 1998a et 1998b ; Mulhbacher et coll., 2001 ; Shiftan et coll., 2000). Cependant, pour des raisons de sécurité et de protection de l'environnement, il est préférable d'utiliser un agent réticulant non halogéné. C'est pourquoi l'agent réticulant utilisé pour fabriquer le Contramid[®], est devenu le sodium de trimétaphosphate (STMP) (Le Bail et coll., 1999 ; Ravenelle et coll., 2002) ou l'oxychlorure de phosphore (POCl₃) (Labopharm, données internes). D'un point de vue pratique, le Contramid[®] en tant qu'excipient a pour avantages (Labopharm, données internes) :

- o Un traitement facile sans utilisation de solvants organiques, permettant l'obtention d'un produit d'une pureté élevée.
- o Une fabrication possible de comprimés solides par simple compression directe.
- o Une bonne compatibilité avec des molécules hydrophiles et hydrophobes, à des concentrations faibles et élevées.
- o Une innocuité de l'amidon en production pour le personnel, et à l'ingestion pour les patients.
- o Une excellente robustesse au niveau de la production et des conditions paramétriques des tests de dissolutions.
- o Une bonne reproductibilité d'un lot de fabrication à l'autre, avec une transposition d'échelle de fabrication simple et prévisible.

1.3.4.3.2. *Caractérisation moléculaire et physico-chimique*

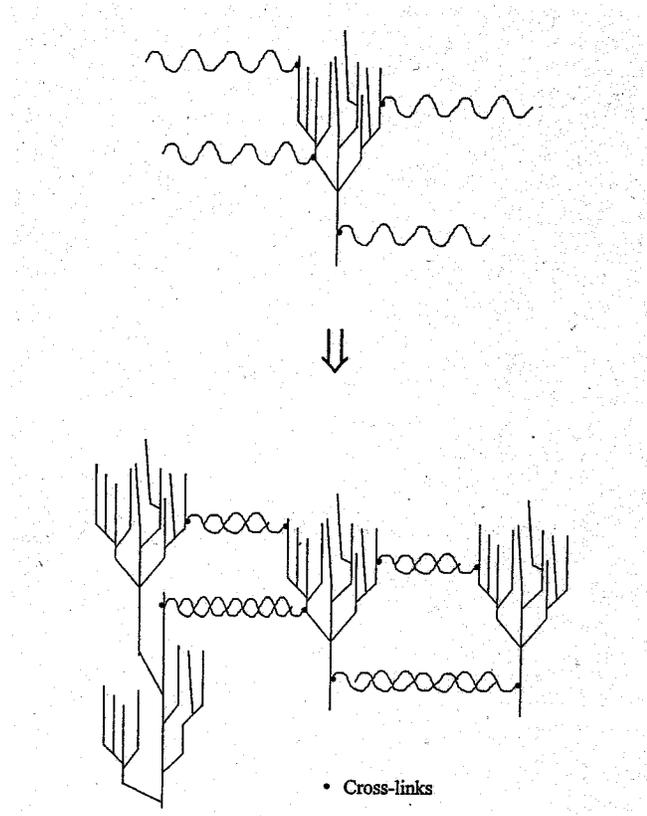
Comme déjà mentionné auparavant, le Contramid[®] a la particularité de contenir 70 % d'amylose et 30 % d'amylopectine. L'amylose peut exister sous différentes formes polymorphiques. Le Contramid[®] en poudre après séchage par vaporisation est essentiellement amorphe, composé d'amylose de type polymorphique V (hélice simple complexée) peu organisée (Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Le Bail et coll., 1999 ; Lenaerts et coll., 1998), indépendamment du degré de réticulation (Lenaerts et coll., 1998). Ces observations sont aussi valables après compression en comprimés solides (Lenaerts et coll., 1998). Cependant, après hydratation, seul le Contramid[®] avec un faible degré de réticulation subit une transformation vers le type polymorphique B (Lenaerts et coll., 1998 ; Shiftan et coll., 2000). Au niveau moléculaire, l'amylopectine dans l'amidon gélatinisé se présente sous forme d'amas ressemblant à des micelles. Lors de la réticulation du Contramid[®], l'amylose semble surtout se fixer à l'interface de ces amas d'amylopectine, essentiellement en simples hélices (type V) (Figure 13). Quand le degré de réticulation n'est pas trop élevé, l'amylose provenant notamment de la phase non cristalline (Le Bail et coll., 1999 ; Shiftan et coll., 2000), est capable de s'organiser en doubles hélices de type polymorphique B (Figure 13) avec la pénétration de l'eau dans le comprimé de Contramid[®] (Le Bail et coll., 1999 ; Lenaerts et coll., 1998 ; Shiftan et coll., 2000). Le Contramid[®] hydraté peut ainsi être représenté sous forme d'amas d'amylopectine en rosettes (micelliformes) autour desquelles s'organisent les doubles hélices d'amylose néoformées (Figure 14) (Labopharm, données internes). Un réseau tridimensionnel stable et solide se forme par des liaisons physiques entre les doubles hélices d'amylose hydratée et les microparticules, formant une pseudo-réticulation (Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Le Bail et coll., 1999 ; Lenaerts et coll., 1998 ; Ravenelle et coll., 2002). Cette transformation entraîne un auto-assemblage et une cohésion des microparticules, donnant naissance à un hydrogel microporeux (Le Bail et coll., 1999 ; Lenaerts et coll., 1998 ; Ravenelle et coll., 2002 ; Shiftan et coll., 2000). Ce phénomène avec les matrices moyennement réticulées, peut

expliquer le contrôle de son gonflement permettant une pénétration d'eau et une cinétique de libération médicamenteuse lentes d'ordre quasi-zéro (Baille et coll., 2002 ; Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Lenaerts et coll., 1998 ; Moussa et Cartilier, 1996). À l'inverse, avec un degré de réticulation plus élevé, les chaînes d'amylose sont moins mobiles à l'hydratation, pour se réarranger en type polymorphique B et par conséquent le type V reste prédominant (Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Le Bail et coll., 1999 ; Lenaerts et coll., 1998). L'amylose de type B étant reconnue pour s'associer avec plus de molécules d'eau que celle de type V (Buléon et coll., 1990), la quantité d'eau retenue par la matrice s'amointrit avec le degré de réticulation, altérant ainsi l'état d'hydrogel nécessaire dans le mécanisme pour obtenir une libération lente (Shiftan et coll., 2000).

En microscopie électronique à balayage, les particules d'amidon du Contramid® en poudre ressemblent à des sphères dégonflées, aspect typique du séchage par vaporisation (Hancock et coll., 2001 ; Le Bail et coll., 1999 ; Rahmouni et coll., 2002). Avec une grande ductilité, le Contramid® est capable d'absorber rapidement l'énergie d'une compression à haute vitesse, en se déformant de manière irréversible (Hancock et coll., 2001). Cette caractéristique est habituellement un avantage pour un excipient parce que la plasticité permet une déformation des particules en augmentant les surfaces de liaisons entre elles (Hancock et coll., 2001). Après compression directe de la poudre de Contramid®, le comprimé solide est caractérisé par une porosité qui diminue avec une force de compression croissante (Moussa et coll., 1998b). À l'échelle microscopique, quand la force de compression augmente, il a été observé une déformation plastique croissante du Contramid®, avec disparition des particules et même fragmentation du matériau (Moussa et coll., 1998b). Ainsi, les particules sphériques subissent une déformation plastique en s'aplatissant à la compression (Le Bail et coll., 1999 ; Rahmouni et coll., 2002). Lors de la pénétration d'eau, ces particules s'étendent préférentiellement dans le sens opposé, c'est-à-dire en direction axiale, pour retrouver leur forme quasi sphérique (Le Bail et coll., 1999).

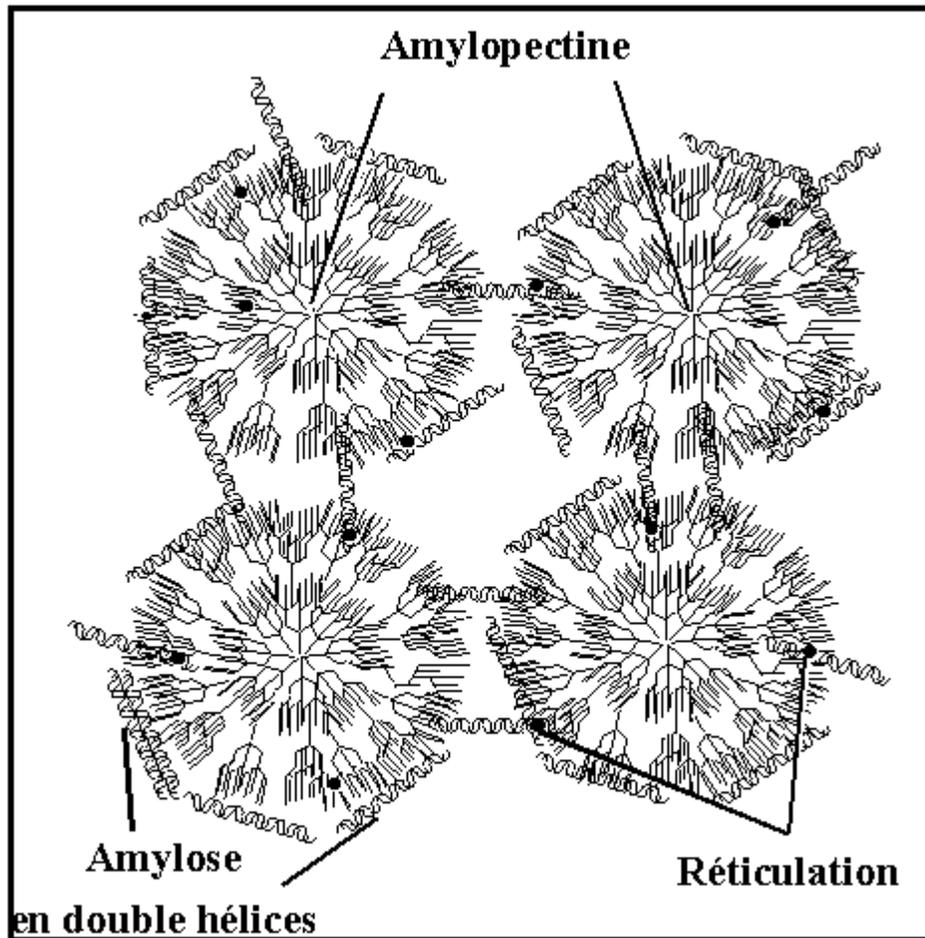
Après granulation, la poudre de Contramid[®] ne possède pas de gros agrégats avec un 90ème centile de taille des particules situé à 360 µm (médiane = 76 µm) (Hancock et coll., 2001) et une moyenne géométrique d'environ 100 µm (Rahmouni et coll., 2002). De plus, elle présente un bon écoulement, caractéristique avantageuse pour la fabrication en comprimés à grande échelle. Le module élastique et la force de tension sont dans les normes des excipients compressibles pour la fabrication de formes galéniques solides (Hancock et coll., 2001).

Il a été démontré qu'une proportion croissante de Contramid[®] dans une matrice augmente la dureté des comprimés pour une force de compression donnée (Dumoulin et coll., 1994). De plus, la dureté des comprimés de Contramid[®] augmente avec la force de compression (Dumoulin et coll., 1994 ; Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Rahmouni et coll., 2001 et 2002). Cependant, la dureté du comprimé augmente pour plafonner à un maximum (Rahmouni et coll., 2002) et ensuite diminuer (Ispas-Szabo et coll., 2000) malgré une force de compression croissante. Au départ, l'aplatissement des particules et le rapprochement des chaînes polymères sont augmentés par une force de compression croissante, favorisant ainsi une meilleure cohésion avec un plus grand nombre de liaisons possibles entre les différents éléments. Cependant, une force trop élevée entraîne une destruction des particules d'où une baisse de la cohésion de la matrice hétérogène et de la dureté du comprimé (Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Ravenelle et coll., 2002). En effet, la dureté du comprimé s'expliquerait par une bonne cohésion de la matrice grâce à son hétérogénéité comme un ciment contenant du gravier. En détruisant les particules avec une force de compression élevée, la matrice devient plus homogène et perd ses propriétés (Ravenelle et coll., 2002). Parallèlement, il a été démontré que l'augmentation de la force de compression à la fabrication des comprimés de Contramid[®], fait diminuer non seulement le diamètre moyen des pores de la matrice solide mais aussi son pourcentage de porosité (Moussa et coll., 1998b ; Rahmouni et coll., 2002).



(Lenaerts et coll., 1998)

Figure 13 : Représentation schématique de la gélatinisation du Contramid[®] avec le réarrangement structurel de l'amylose en doubles hélices de type B (en bas) à partir des simples hélices de type V (en haut). L'amylopectine (formes arborescentes) se retrouve ainsi pseudoréticulée.



(Labopharm, données internes)

Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire du Contramid® après gonflement dans un milieu tampon.

1.3.4.3.3. Propriétés physiques et mécaniques de gonflement

Par analyse d'image, il a été observé tout d'abord un gonflement anisotrope des comprimés de Contramid®, avec une augmentation supérieure en direction axiale par rapport à la direction radiale (Lenaerts et coll., 1998 ; Moussa et Cartilier, 1996). Les vitesses de gonflement axial et radial étaient rapides pendant les 5 à 10 premières minutes en atteignant respectivement 35 % et 5 %, pour ensuite ralentir (Lenaerts et coll., 1998).

Les gonflements axial et radial étaient respectivement d'environ 55 % et 15 % après une heure d'immersion, et d'environ 75 % et 45 % à l'équilibre (Lenaerts et coll., 1998 ; Moussa et coll., 1998b). L'augmentation du degré de réticulation du Contramid[®] diminue le contrôle du gonflement en augmentant la vitesse de pénétration de l'eau et le gonflement à l'équilibre des comprimés (Dumoulin et coll., 1994 ; Moussa et Cartilier, 1996). Le volume de gonflement à l'équilibre passe ainsi d'environ 250 % à plus de 400 %. Des raisons de rigidité du réseau polymère et d'incapacité de transformation de l'amylose amorphe en doubles hélices de type B ont été mentionnées auparavant.

Le gonflement anisotrope (axial > radial) peut être causé par une plus grande surface de contact sur les bords frontaux (Moussa et Cartilier, 1996). Il peut aussi s'expliquer par l'arrangement des chaînes polymères et l'aplatissement des particules à la compression (direction axiale) qui finalement cherchent à reprendre leur forme quasi-sphérique lors de la pénétration de l'eau (Le Bail et coll., 1999 ; Moussa et Cartilier, 1996 ; Ravenelle et coll., 2002).

Une couche de gel homogène à la surface des comprimés est visible par analyse d'image dès les premières minutes de l'immersion (Lenaerts et coll., 1998 ; Moussa et coll. 1998a). Par la suite, elle n'évolue guère en épaisseur et finit par se stabiliser alors que le front de diffusion d'eau se poursuit vers le centre du comprimé pour l'atteindre après 25 minutes (Moussa et coll., 1998a).

En résonance magnétique, la description des étapes d'hydratation du comprimé de Contramid[®], était similaire (Baille et coll., 2002). La diffusion de l'eau dans le plan radial était isotrope et plus rapide à 37 qu'à 25 °C, atteignant un équilibre en 39 heures environ. Si la cinétique de diffusion de l'eau est d'ordre zéro à 25 °C, elle devient anormale à 37 °C. La pénétration de l'eau dans la matrice de Contramid[®] semble donc évoluer d'une cinétique d'ordre zéro (contrôle par relaxation) à une cinétique fickienne (contrôle par diffusion) quand la température augmente (Baille et coll., 2002).

Les propriétés de gonflement des comprimés de Contramid[®] sont modifiées par la variation de la force ionique du milieu tampon. La vitesse de prise d'eau et le gonflement à l'équilibre diminuent quand la concentration en NaCl augmente dans le milieu (Moussa et coll., 1998b). Le gonflement à l'équilibre dans une solution tampon phosphate (PBS) diminue de 7 et 5 % respectivement en directions axiale et radiale (Ravenelle et coll., 2002).

Il a été démontré qu'un comprimé de Contramid[®] hydraté à l'état d'équilibre a une viscoélasticité non linéaire (Ravenelle et coll., 2002). Une série de compressions entraîne des modifications irréversibles de la matrice gonflée avec notamment une augmentation de la rigidité d'équilibre. Cette rigidité diminue quand le comprimé est fabriqué avec des forces de compression croissantes, phénomène qui serait expliqué par une augmentation de l'homogénéité de la matrice.

Pour obtenir un gonflement uniforme tout en conservant l'intégrité du comprimé par les liaisons physiques qui entraînent une pseudo-réticulation, il faut qu'antérieurement, la réticulation chimique et le séchage par vaporisation pendant la préparation du Contramid[®] apportent une distribution uniforme de l'amylopectine et de l'amylose avec une grande proportion non cristalline (Ravenelle et coll., 2002). Une cristallinité et une réticulation optimales de l'amidon préviennent la désintégration du comprimé qui se comporte alors comme une éponge ayant un lent gonflement (Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Ravenelle et coll., 2002). Le contrôle du gonflement s'effectue grâce à la formation d'un réseau hydrogel microporeux stable, rendue possible par un phénomène d'auto-assemblage et de cohésion des particules due à la transformation de l'amylose amorphe en doubles hélices de type B (Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Le Bail et coll., 1999 ; Lenaerts et coll., 1998 ; Ravenelle et coll., 2002 ; Shiftan et coll., 2000).

En ce qui concerne la texture, deux parties distinctes ont pu être décrites en microscopie électronique à balayage sur des comprimés de Contramid[®] séchés après gonflement dans l'eau (Le Bail et coll., 1999 ; Ravenelle et coll., 2002) :

- o Une membrane de surface enveloppe le comprimé et se caractérise par une microporosité de l'ordre du nanomètre. Elle pourrait correspondre à la couche homogène de gel décrite par analyse d'image (Moussa et coll., 1998a). Cette couche périphérique se développe dans les premières minutes qui suivent l'immersion du comprimé. Elle semble résulter de la fusion complète des particules sphériques et jouer le rôle de filtre de régulation dans le contrôle de la libération d'un principe actif.
- o Une partie intérieure plus hétérogène se distingue par des pores de plus grande taille (30 – 40 µm). En fait, cette partie ressemble plus à une éponge en aspect et en comportement. Elle résulterait de la complète coalescence des particules sphériques après séchage pour la microscopie électronique. On peut penser que cette coalescence des particules existe déjà en partie lors de l'hydratation et que la texture adhésive des doubles hélices d'amylose de type B permet une pseudo-réticulation entre ces particules assurant une complète coalition de l'ensemble de la matrice. Les pores sont alors plus des domaines de faible densité de polymère hydraté que de véritables canaux.

1.3.4.3.4. Propriétés de libération contrôlée

Initialement, le Contramid[®] a été développé pour ses propriétés de libération contrôlée. En effet, il permet la libération d'un principe actif suivant une cinétique d'ordre quasi zéro sur une période de 12 – 24 heures (Lenaerts et coll., 1991 et 1998). Avec un coût de production faible et facilement compressible, le Contramid[®] est vite devenu un candidat fort intéressant pour la conception des formes galéniques solides ayant des propriétés de libération contrôlée, destinées à l'administration par voie orale chez l'Homme (Lenaerts et coll., 1998).

L'augmentation du degré de réticulation à la fabrication du Contramid[®] diminue la capacité des chaînes d'amylose de type V à se réarranger en doubles hélices de type B sous l'effet de l'hydratation. Le gonflement n'est plus contrôlé, la viscosité du gel est réduite et

la libération du principe actif est accélérée (Ispas-Szabo et coll., 2000 ; Lenaerts et coll., 1991 et 1992).

La cinétique de libération d'un principe actif est apparue indépendante de la force ionique du milieu tampon (Rahmouni et coll., 2001) et de celle de compression de fabrication (Lenaerts et coll., 1992 ; Rahmouni et coll., 2001) tant que cette dernière est située au dessus du seuil critique de 6 kN (Rahmouni et coll., 2001).

Un principe actif peu soluble peut être incorporé jusqu'à concurrence de 70 à 90 % de la masse totale du comprimé. Comme le Contramid[®] est une matrice hydrophile, la charge d'un principe actif très soluble ne doit pas dépasser 30 à 50 % de la masse du comprimé (Labopharm, données internes). La libération du principe actif n'est plus contrôlée (accélération) quand la charge dépasse une valeur maximale qui dépend du degré de réticulation du Contramid[®] (Lenaerts et coll., 1991 et 1992). En fait, la charge maximale du principe actif diminue quand le degré de réticulation augmente (Lenaerts et coll., 1992). De manière plus marginale, les propriétés de libération contrôlée peuvent être conservées avec une charge élevée (60 %) de principe actif soluble, grâce à une transformation chimique préalable du Contramid[®] en dérivés par substitution de groupements chimiques ioniques ou neutres (Mulhbacher et coll., 2001). En fait, il ne s'agit plus vraiment de Contramid[®] mais plutôt d'une autre catégorie de matrices amidonnées à teneur élevée en amylose substituée. Dans cette direction, une étude antérieure avait démontré que l'amylose non réticulée mais chimiquement substituée a des propriétés de libération contrôlée d'un principe actif en fonction de l'agent substituant et du degré de substitution (Chebli et coll., 1999).

La couche homogène de gel périphérique décrite par analyse d'image (Moussa et Cartilier, 1996) et microscopie électronique (Le Bail et coll., 1999 ; Ravenelle et coll., 2002), peut jouer un rôle de filtre qui impose, dès le début de l'immersion (Moussa et coll., 1998a), un contrôle de la libération du principe actif présent dans la partie spongiforme.

Ainsi, un comprimé de Contramid[®] gonflé ressemble à une éponge imbibée d'eau pleine de principe actif contenu dans plusieurs réservoirs (Le Bail et coll., 1999). La libération lente serait le résultat d'une diffusion à travers plusieurs membranes internes.

En présence d' α -amylase dans le milieu tampon, la libération du principe actif reste contrôlée par un mécanisme de diffusion pour une concentration d'enzyme faible alors qu'un mécanisme d'érosion vient s'ajouter quand la concentration de l'enzyme augmente en accélérant ainsi la cinétique de libération (Rahmouni et coll., 2001). L'ajout d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) dans la matrice permet de protéger le Contramid[®] contre l'érosion par l' α -amylase et donc de conserver le contrôle de la libération d'une molécule dans un milieu enzymatique (Chouinard et coll., 1997 ; Rahmouni et coll., 2001).

En conclusion de ce chapitre, la recherche dans le domaine des systèmes implantables à libération contrôlée, est en pleine effervescence. Cependant, beaucoup reste à faire, notamment sur la biodégradation de tels systèmes, impliquant de nouveau la notion de biocompatibilité, et sur la cinétique de libération où l'ordre zéro est le plus souvent recherché. Les systèmes développés dans le futur répondront de plus en plus à la demande d'une libération constante de principe actif sur de longues périodes de temps pour un traitement prolongé chez les patients atteints de maladies chroniques. Parallèlement, de nombreux principes actifs nouvellement développés sont formulés à partir de protéines ou peptides qui sont instables à l'administration orale. Ainsi, un implant à libération contrôlée devient de plus en plus une solution de choix dans un traitement. Enfin, les nouveaux systèmes implantables aideront à réduire le coût des traitements, tout en augmentant leur taux de réussite grâce à une meilleure efficacité du principe actif et une meilleure observance thérapeutique. Ces systèmes pourront ainsi offrir aux patients, une plus grande liberté et une meilleure qualité de vie.

2. Travaux de thèse

Comme le Contramid[®] a montré des capacités de libération contrôlée d'un principe actif *in vitro*, cet amidon modifié est actuellement évalué dans le développement de formes galéniques permettant la libération contrôlée de médicaments après administration par voie orale chez l'Homme. De plus, l'amidon, notamment sous forme de microsphères, a été testé avec succès par voie parentérale, en démontrant des propriétés de biocompatibilité, de biodégradation et même de libération de principe actif. De nature polysaccharidique et d'origine naturelle, il est tout à fait concevable de croire que le Contramid[®] est biocompatible après implantation. Ainsi est née l'hypothèse que le Contramid[®] est un matériau qui peut être utilisé sous la forme d'un implant solide après compression directe, pour permettre la libération prolongée systémique ou locale d'un principe actif après administration parentérale.

Pour répondre à cette hypothèse, les travaux de ce doctorat ont visé les objectifs suivants :

- o Évaluer la réponse de l'hôte après implantation sous-cutanée (Article 1).
- o Démontrer la capacité du Contramid[®] à contrôler la libération d'un principe actif *in vivo* (Article 1).
- o Caractériser la réaction de l'hôte et la dégradation du Contramid[®] après implantations sous-cutanée et intramusculaire (Article 2).
- o Caractériser *in vitro* les propriétés de plusieurs formulations d'implants Contramid[®] chargé en ciprofloxacine pour choisir celle(s) à tester *in vivo* (Article 3).
- o Déterminer *in vivo* la formulation d'implant Contramid[®] qui permet une libération de ciprofloxacine locale élevée et durable (Article 4).

Ces objectifs ont permis de définir la biocompatibilité et la biofonctionnalité du Contramid[®], tout en appréhendant la performance *in vivo* de l'implant notamment pour la prévention et/ou le traitement local de l'ostéomyélite comme première application biomédicale.

2.1. Article 1 : Characterization of subcutaneous Contramid[®] implantation: host response and delivery of a potent analog of the growth hormone-releasing factor

Cyril Désévaux ^{a,b*}, Christiane Girard ^c, Vincent Lenaerts ^b, Pascal Dubreuil ^c

^a Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Montreal, Qc, H3C 3J7, Canada

^b Labopharm inc., 1208 Bergar, Laval, Qc, H7L 5A2, Canada

^c Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qc, J2S 7C6, Canada

* Corresponding author: mailing address: Labopharm inc., 1208 Bergar, Laval, Qc, H7L 5A2, Canada. Tel.: (450) 773-8521, Fax.: (450) 778-8113, email: cyril.desevaux@umontreal.ca

Reprinted from *International Journal of Pharmaceutics* 232 : 119-129, © Copyright (2002), with permission from Elsevier Science.

2.1.1. Abstract

Cross-linked high amylose starch (Contramid[®]) was investigated as a solid implant for evaluation of host response in mice and as a possible delivery system for a human growth hormone-releasing factor analog (Hex-hGRF) release profile in pigs. Seventy mice were administered subcutaneously one 3-mm diameter Contramid[®] pellet and host reaction was evaluated over six months. Thirty pigs were divided into four groups. All animals of the three implanted groups were administered subcutaneously 15 mg Hex-hGRF: 1) one pure Hex-hGRF implant, 2) four 30/70 w/w Hex-hGRF/Contramid[®] implants or 3) eight

15/85 w/w Hex-hGRF/Contramid[®] implants. The fourth group (n = 6) was injected subcutaneously twice daily with 10 µg/kg of Hex-hGRF over five consecutive days. Serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) was monitored over one month. In mice, no adverse reaction occurred after implantation. Macroscopic and microscopic inflammatory reactions were always localized. Polymorphonuclear cells and macrophages predominated within and around the pellets, respectively. Thin fibrovascular septa eventually subdivided Contramid[®] pellets which were progressively phagocytosed by macrophages. In pigs, serum IGF-I concentrations were increased over a ten day period in all implanted groups. The initial IGF-I peak observed in the daily injected group was avoided in both Contramid[®] implant groups but not in the pure Hex-hGRF implant group. These encouraging results warrant the development of Contramid[®] implants as a sustained delivery system for peptidic drugs.

2.1.2. Keywords

Cross-linked starch; Implant; Biocompatibility; Controlled release; GRF

2.1.3. Introduction

Cross-linked high amylose starch (Contramid[®]) is a water insoluble polymer and a hydrophilic swelling matrix that was originally developed as a controlled release solid oral dosage forms characterized by a quasi zero order drug delivery over 12 to 24 hours (Lenaerts et al., 1991; Lenaerts et al., 1998). Previous work using degradable starch microspheres administered nasally as dry powder showed an acceptable biocompatibility (Björk et al., 1991). Bioavailabilities of nasal insulin was improved when administered with starch in rats (Björk and Edman, 1988, 1990) and rabbits (Callens and Remon, 2000) as well as nasal gentamicin in sheep (Illum et al., 1988). Degradable starch microspheres with a chemotherapeutic agent have also been used in humans by hepatic arterial injection in order to create embolization and selectively to increase drug exposure to liver tumors (Dakhil et al., 1982). Starch microparticles were less stimulatory to the macrophages *in*

vitro than other polysaccharides (Artursson et al., 1987a). Microparticulate starch has also been shown to be rapidly cleared from blood in mice with an uptake mainly in the liver (Laakso et al., 1986).

Growth promoting implants using steroids have been used for over 40 years in livestock production (Preston, 1999). However parenteral devices for systemic extended release of peptide and/or protein are continuously under development in veterinary medicine. One of the limiting factors is the cost of existing biodegradable polymeric systems which is not compatible with veterinary use. However Contramid[®] is a very cost efficient polymer drug delivery system. Growth hormone (GH) secretion and insulin-like growth factor-I (IGF-I) plasma concentrations are closely related to growth performance, body composition and milk production in farmed animals (Dubreuil et al., 1990; Klindt et al., 1995; Klindt et al., 1998; Foster, 1999). The pulsatile pattern of pituitary GH secretion results from the interaction of three hypothalamic factors (Tannenbaum, 1990; Kojima et al., 1999). Two are stimulatory: growth hormone-releasing factor (GRF) and Ghrelin. The third is inhibitory: somatostatin. Growth hormone acts on adipose tissue stimulating lipolysis and increases the production of IGF-I which stimulates protein synthesis (Corpas et al., 1993a). Twice daily subcutaneous injections (Corpas et al., 1992) and continuous infusion (Corpas et al., 1993b) of the human GRF over two weeks to elderly humans reversed age-related GH and IGF-I decreases and restored subnormal GH secretion and IGF-I concentrations, respectively. Moreover somatotroph cell desensitization or depletion did not occur with continuous intravenous GRF infusion in humans over the same period of time (Vance et al., 1989) and in pigs over six days (Dubreuil et al., 1991). A GRF controlled delivery system should enhance GH secretion peaks during the non refractory responsive periods (Dubreuil et al., 1987) and may have a great interest in domestic animal production.

It is likely that Contramid[®] is a biocompatible polymer when implanted and can be administered parenterally for systemic or local extended release of a drug. The objectives of

this study were: 1) to evaluate local host reaction when Contramid[®] is subcutaneously implanted in an animal model over a 180 day period and 2) to determine the capacity of GRF analog loaded Contramid[®] pellets at regulating the release of this active peptide in growing pigs.

2.1.4. Materials and methods

2.1.4.1. Preparation of pellets

2.1.4.1.1. Mouse pellet

For assessment of Contramid[®] biotolerance in mice, dry blends of Contramid[®] with 16 % w/w of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) were compressed using a 3-mm round punch providing 3-mm-thick 25 mg placebo pellets.

2.1.4.1.2. Pig pellet

A potent analog of the natural human growth hormone-releasing factor, the hexenoyl-trans-3-hGRF(1-44)NH₂ (Hex-hGRF, Theratechnologies inc., Quebec, Canada) was used. Three formulations were prepared by compression for solid implant manufacturing: the first formulation was 15 mg of pure Hex-hGRF peptide; the second and third formulations were dry blends of Contramid[®]/HPMC (84/16 w/w) with 30 and 15 % w/w of Hex-hGRF, respectively. All pellets weighed 15 mg and measured 3 mm in diameter.

2.1.4.2. Surgical procedure in mice

Seventy 20-25 g, 8-week old CD1 mice were used to evaluate the host reaction to subcutaneous implantation of Contramid[®]. The mice were randomly allotted in seven

groups of ten animals which corresponded to the implantation time periods of 3, 7, 14, 30, 60, 120 and 180 days. Mice were anesthetized with intra-peritoneal administration of 2.5 mg ketamine hydrochloride (Rogarsetic, Rogar/STB inc., Ontario, Canada) and 0.25 mg xylazine (Rompun, Bayer inc., Ontario, Canada) simultaneously. The dorsal area of each animal was aseptically prepared for surgery by shaving and scrubbing with povidone iodine (Iodovet, Rougier inc., Quebec, Canada). A 5 mm lumbar midline skin incision was performed followed by a 1 cm subcutaneous (SC) cranially directed tunnel. One placebo Contramid[®] pellet was implanted and skin was then sutured with a 4-0 non absorbable monofilament nylon (Ethilon[™], Ethicon inc., Ontario, Canada). The animals were placed in individual cages, fed a normal diet and clinically monitored. Animals were euthanized by carbon dioxide asphyxiation. Post-mortem examinations were limited to implantation sites. Lumbodorsal skin was resected, implantation sites were located and exposed for macroscopic examination. The implant with surrounding tissue was excised *en bloc* from mice and fixed in 10% buffered formalin solution for 24 hours. The specimens were embedded in paraffin and 4 µm thick sections were performed.

2.1.4.3. Histologic examination

Histologic sections were stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS). Periodic acid-Schiff (PAS) stain was also performed on two animals of each group. The slides were examined by two independent observers (CD, CG). The type of inflammatory cells and the presence of a fibrous capsule were evaluated. The density of inflammatory reaction was graded as follows: 0, no infiltrate; +, minimal infiltrate; ++, moderate infiltrate; and +++, marked infiltrate (Gomel et al., 1980; Neff et al., 1985).

2.1.4.4. Implantation in pigs

Thirty growing pigs weighing 50 ± 4 kg were randomly allotted into four treatment groups. In three groups (n = 8), animals were subcutaneously implanted at the level of the thoracic area near the elbow 1, 4 or 8 pellets with a 10 G trocar. All animals were

administered a total dose of 15 mg GRF and the number of implants per animal depended on the payload: one implant of pure Hex-hGRF in the first group (n = 8); four 30%-Hex-hGRF loaded Contramid[®] implants in the second group (n = 8); and eight 15%-Hex-hGRF loaded Contramid[®] implants in the third group (n = 8). In a fourth group, six pigs were injected subcutaneously (10 µg/kg Hex-hGRF), every 12 hours over 5 consecutive days and served as a positive control. Animals were individually kept in pens of 1.5 X 2.5 m and fed *ad libitum*. Daily clinical monitoring was performed until the end of the study. Venous blood samples were taken by venipuncture on days -1, 0, 2, 4, 7, 10, 14, 18, 22, 26 and 31 in groups 1, 2 and 3, and on days 0, 3, 6 and 9 in group 4. Serum IGF-I concentrations were determined by radioimmunoassay (Abribat et al., 1990).

All animal procedures performed in the present study were previously approved by the animal welfare ethic committee of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal.

2.1.4.5. Statistical analysis

Data generated in pigs (groups 1, 2 and 3) were analyzed using repeated-measures ANOVA with treatments and time as main factors. Separate one way ANOVA with Tukey's *post hoc* contrasts were used to test treatment pair's differences at each time point. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant.

2.1.5. Results

2.1.5.1. Host response to Contramid[®]

Neither mortality nor general behaviour modification was observed in mice. A 5-mm diameter area of subcutaneous edema appeared transiently on the first five days post-implantation around the implant. Wound drainage was observed in five animals (7 %) of

different groups one week after implantation and the implant was always observed in place at post-mortem examination.

On macroscopic examination, Contramid[®] implants appeared as swelled pellets on day 3 and 7, then as gels on days 14 and 30. A thin fibrous capsule developed later and a small fibrous nodule eventually took place on day 180. Inflammatory reaction was always strictly limited to the implantation site without extension to surrounding tissues. Reaction diameter including the implant decreased from 5 to 2 mm from day 3 to 180, respectively. Mild hyperemia was observed close to the implant until day 60 in some animals. On day 3, inflammatory response was less intense around the implant than around the skin incision site (Figure 1).

Recorded histologic grade score is reported in Table 1 for each group. Host reaction was similar in every animal. The predominant inflammatory cells associated to implanted Contramid[®] were polymorphonuclear cells (PMNs) and macrophages (Figure 2). PMNs were mainly found in small groups inside the pellets. Inversely macrophages only surrounded the implant. From day 14 to 180, macrophage cytoplasm was spumous. Small number of lymphocytes were always observed while a few giant cells appeared only on day 180.

Neovascularization and fibrous septa were observed within the implant on days 7 and 14, respectively. Fibrovascular organization developed gently over time resulting in a complete fragmentation of the pellet (Figure 3). A loose peripheral well-vascularized connective tissue developed around implants.

Periodic acid-Schiff stains specifically polysaccharides magenta including Contramid[®]. Contramid[®] and polysaccharidic by-products were always detected on PAS sections until day 180 (Figure 3) and eventually in macrophage cytoplasm (Figure 4). However the total amount of Contramid[®] at the implantation site decreased and the macrophage crown shrunk over time.

Table 1 : Description of histologic reaction grade score to subcutaneous implanted Contramid[®] in mice. PMNs = polymorphonuclear cells

Days	PMNs	Macrophages	Giant cells	Lymphocytes
3	+++	+ / +++	0	0 / +
7	+++	+++	0	+ / +++
14	++ / ++++	+++	0	+ / +++
30	+ / +++	+++	0	0 / +
60	0	+++	0	0 / +
120	0	+++	0	+ / +++
180	0	+++	0 / +	+ / +++

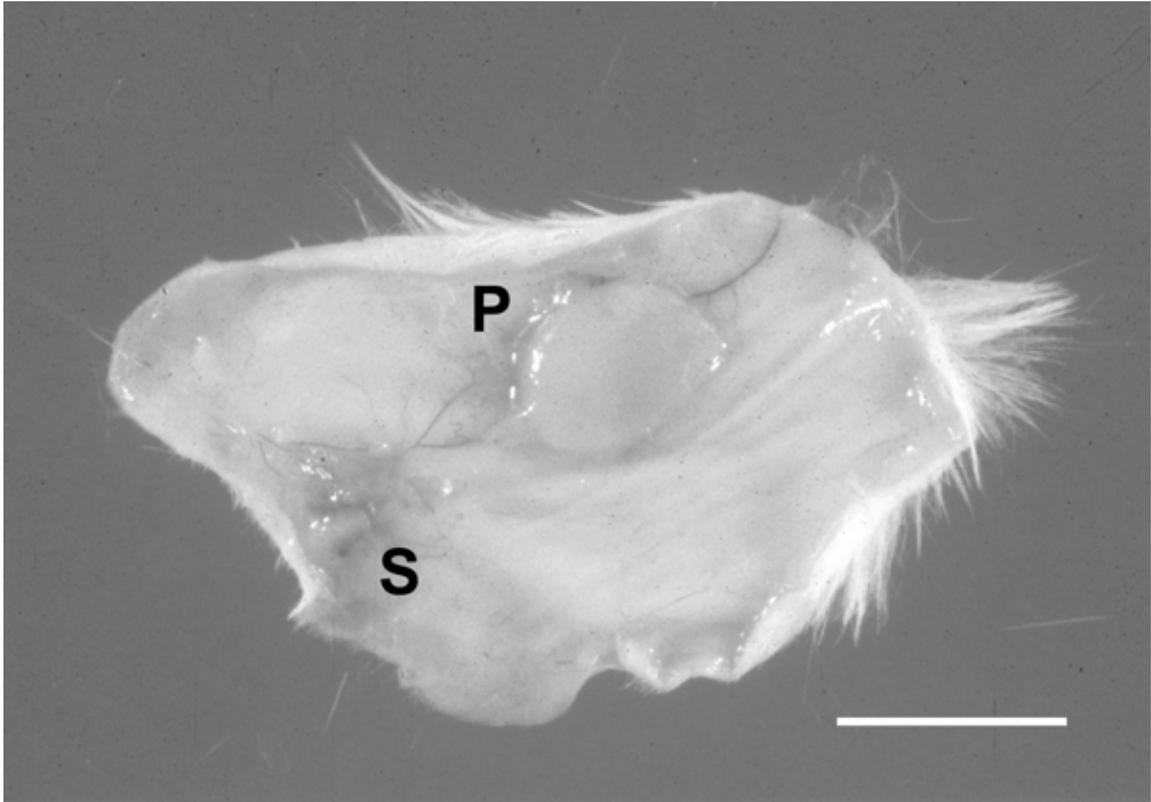


Figure 1 : Subcutaneous tissue. Mouse. Swollen Contramid[®] pellet (P) 3 days after implantation. Note the inflammation associated with the suture (S) (bar = 1 cm).

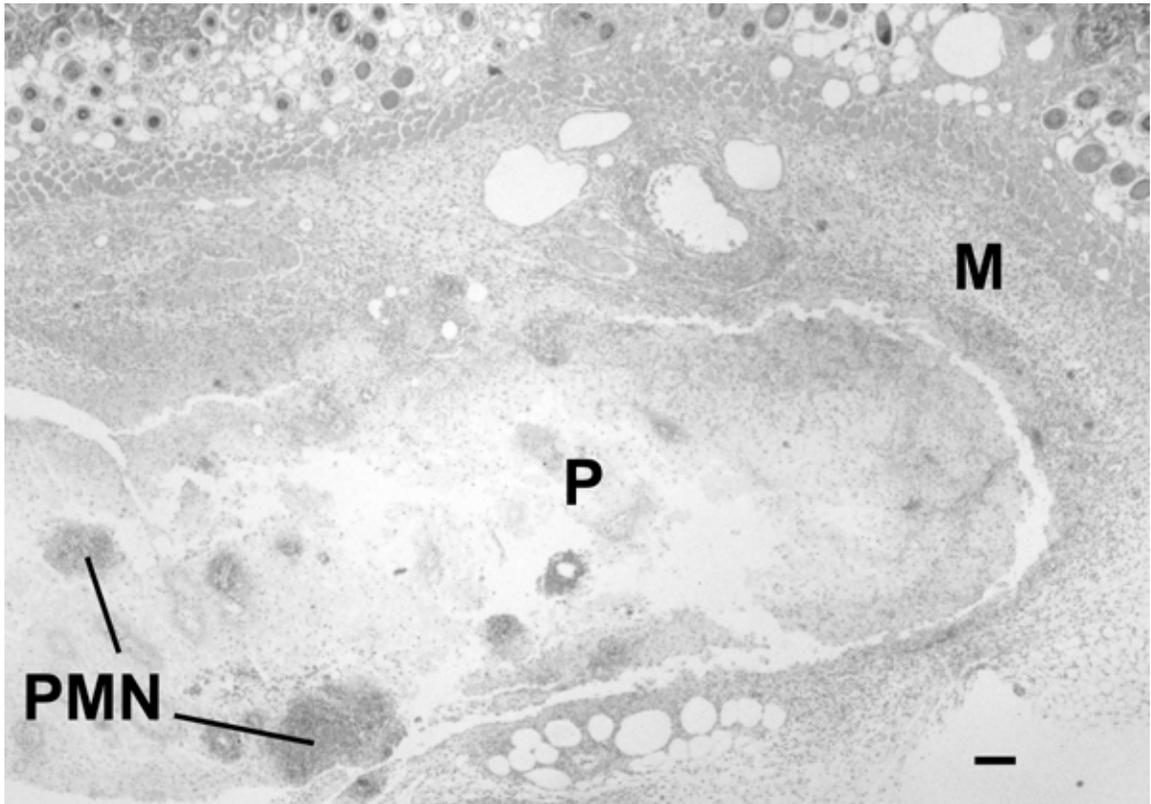


Figure 2 : Subcutaneous tissue. Mouse. Microscopic aspect of Contramid[®] pellet at day 7. The pellet (P) is infiltrated by polymorphonuclear cells (PMN) and surrounded by macrophages (M). HPS stain (bar = 100 μ m).

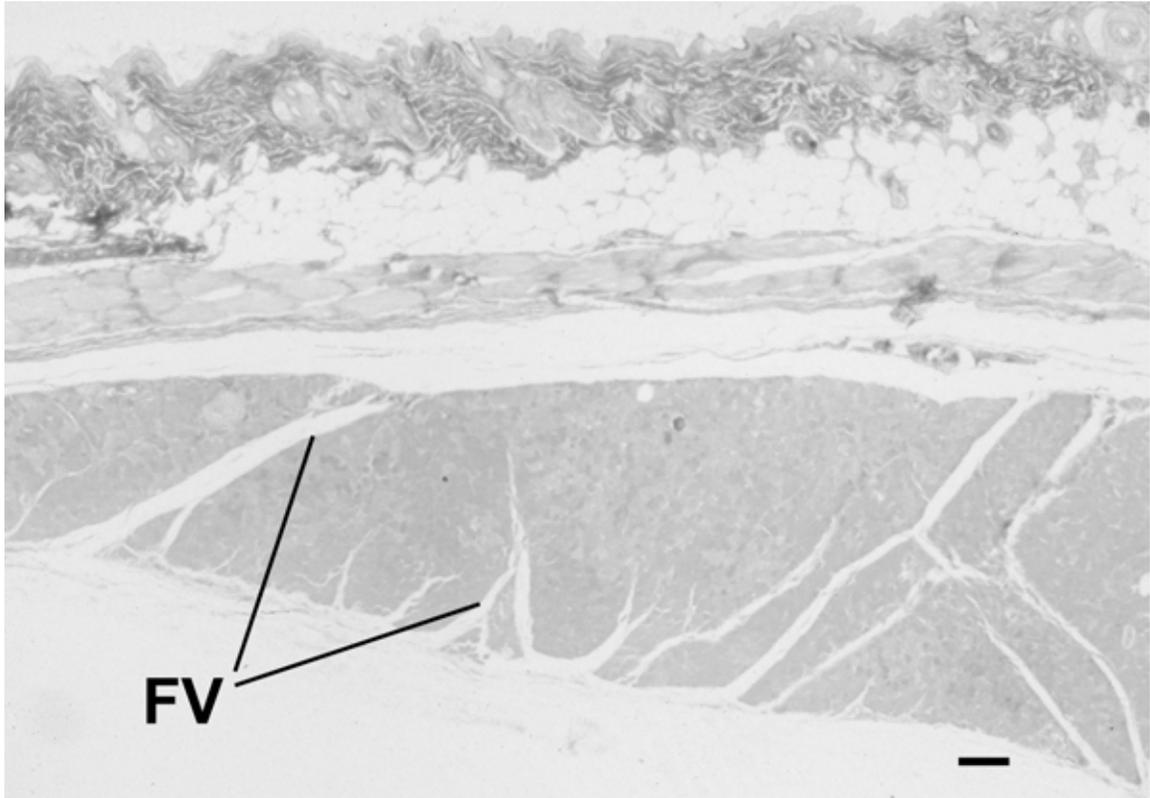


Figure 3 : Subcutaneous tissue. Mouse. Presence of PAS positive material at the implantation site (day 180) with fibrovascular septa (FV) and thin peripheral fibrous tissue. PAS stain (bar = 100 μ m).

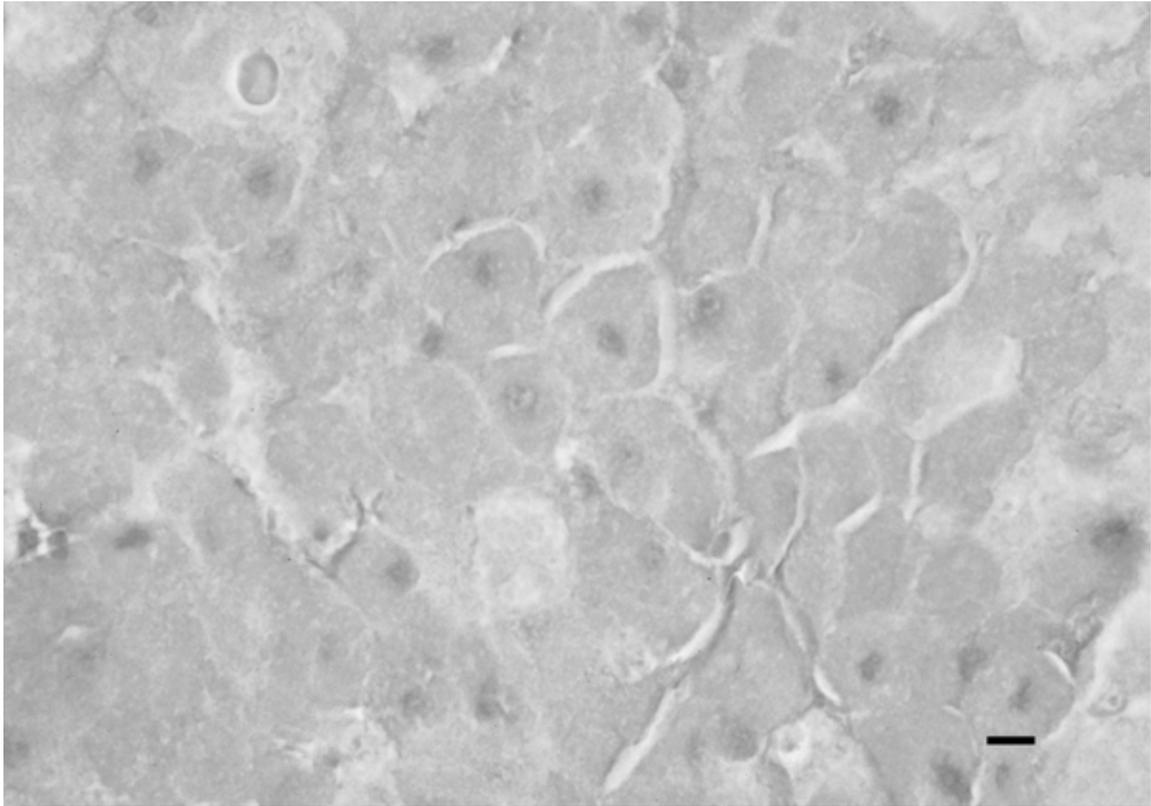


Figure 4 : Subcutaneous tissue. Mouse. PAS positive material localized in spumous cytoplasm of macrophages at day 180. PAS stain (bar = 5 μ m).

2.1.5.2. Hex-hGRF delivery in pigs

No animal exhibited pain, discomfort or local adverse reaction following implantation. Means of relative serum IGF-I concentrations compared to their respective initial levels (days -1 and 0) are shown in Figure 5. The IGF-I concentrations were increased over a period of 10-14 days in all implanted groups and returned to baseline thereafter. In the pure Hex-hGRF implant group, IGF-I increased to the same extent as in the injection group on day 6 with a two-fold increased concentration. Inversely burst was avoided for both Contramid[®] groups with a 1.5-fold increase plateau.

The three implanted groups had IGF-I concentrations significantly different ($p = 0.038$). Significant time effect and treatment-time interaction were observed ($p < 0.05$). Tukey's contrast test revealed a statistical difference ($p = 0.033$) between pure Hex-hGRF and Contramid[®]/Hex-hGRF (70/30) treatments, irrespective of the sampling day. However when performed at each time point, contrast test revealed pure Hex-hGRF implant treatment to be significantly different ($p < 0.05$) to both Contramid[®]/Hex-hGRF treatments on days 4, 7, and 10 while significant differences between the two Contramid[®] treatments were not detected ($p > 0.05$). Significant time effect and treatment-time interaction were also observed ($p < 0.05$).

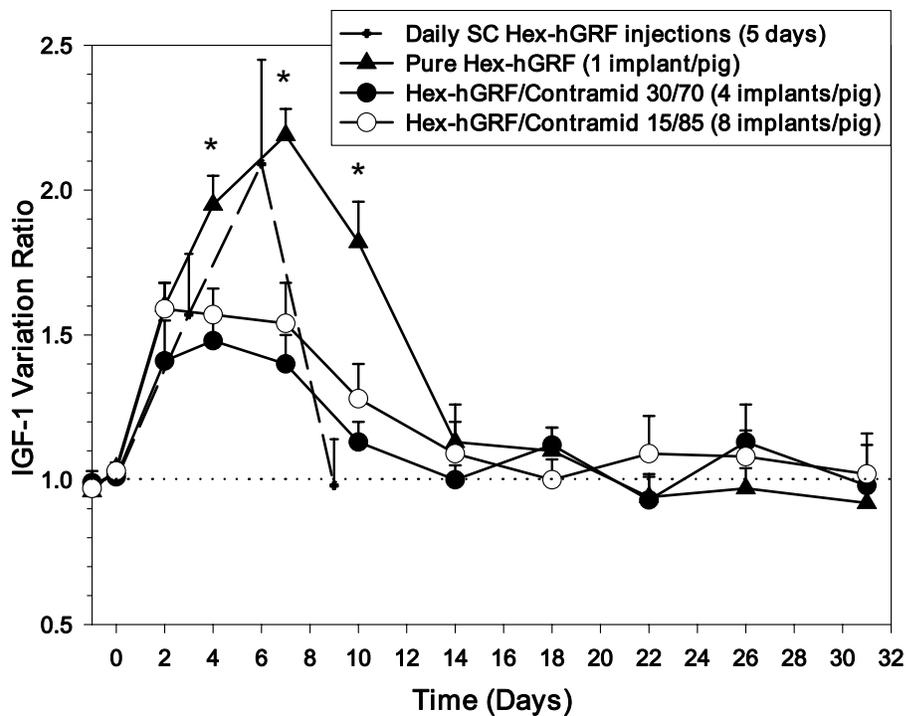


Figure 5 : Comparative effect on IGF-I secretion of three different Hex-hGRF (15 mg) implant formulations used in 8 pigs per group and one solution injected (10 μ g/kg BID for 5 days) in 6 pigs (* $p < 0.05$). The average of initial IGF-I level is represented by the dotted line (....).

2.1.6. Discussion

This work reports for the first time the biocompatibility of Contramid[®]. The study was performed in mice because this animal model facilitates evaluation of a local reaction, pellet explantation and histologic examination over a period of six months. In pigs, local host response monitoring and implant retrieval would have been more difficult and less reliable. However the subsequent Hex-hGRF delivery study was performed in a larger animal model like pigs in order to manufacture implants of an appropriate size and to use an adequate blood sampling procedure for IGF-I assay. Moreover a potential application of such an implant in pigs is the improvement of carcass quality (Dubreuil et al., 1990; Klindt et al., 1995).

A 5-mm edema was always observed in mice at the implantation site over the first week. This was likely caused by the swelling of the polymeric matrix. Other clinical signs of inflammation (i.e. redness, heat and pain) (Tizard, 1996) were indeed never observed. Contramid[®] is a hydrophilic polysaccharide characterized by an axial and radial swelling (Moussa and Cartilier, 1996). Tablet expansion occurs quickly in the early stages of hydration (Moussa et al., 1998). This process is believed to start immediately after the implantation procedure and is likely to be slower *in vivo* than *in vitro* due to the limited availability of fluid. Wound drainage which occurred in some mice was probably more a complication of the surgical intervention instead of the host response to the polymer itself. Indeed macroscopic and microscopic observations of the corresponding implants in these animals were not different from other animals.

These results demonstrate an excellent biocompatibility of Contramid[®] implants. Similarly starch microspheres have been shown to be biocompatible when administered nasally in rabbits (Björk et al., 1991). Because they are degraded by serum amylase, starch microspheres were also used successfully and without toxicity in combination with a chemotherapeutic agent in humans by hepatic arterial injection in order to create a transient

embolization (Dakhil et al., 1982). Neither toxicity nor morphological changes were observed when macrophages were exposed to starch microparticles *in vitro* (Artursson et al., 1987a).

It is of paramount importance to determine the type, duration and magnitude of cellular response in order to ascertain the biocompatibility of a material. Usual sequence of local reaction events after implantation of a biomaterial is acute then chronic inflammation followed by granulation tissue, foreign body reaction and then fibrosis (Anderson, 1994). Acute and chronic inflammatory responses are characterized by the predominance of short lifetime neutrophils and long lifetime macrophages respectively. The temporal sequence of microscopic events observed in mice has demonstrated that Contramid[®] is a biocompatible material. However, intensity and time duration of previously described reaction steps may vary depending on the implant tested (Anderson, 1994).

Macrophages were a key component of the response to implanted Contramid[®]. It was the predominant inflammatory cell type observed from day 7 to 180 with a marked but local accumulation to the implantation site. It is known that macrophages may settle at the interface of implants for extended periods of time (Anderson and Miller, 1984). Furthermore it has been established that macrophages are stimulated by microparticulate polysaccharides, including starch but at a lesser extent (Artursson et al., 1987a). However, starch has no effect on macrophage nonspecific defense response such as cytotoxic activity (Artursson et al., 1987b). In the present study, spumous macrophage cytoplasm from day 14 denoted a phagocytic activity. In addition, intracellular accumulation of PAS positive material was observed and the macrophage crown surrounding the implant as well as the amount of polymer were decreasing over time. In view of these findings, it can be concluded that Contramid[®] was degraded and eventually phagocytosed. An initial hydrolytic degradation of Contramid[®] is conceivable. Starch microparticles are degraded by serum α -amylase (Forsberg, 1978) and recently an enzymatic degradation of Contramid[®] tablets with α -amylase was reported (Rahmouni et al., 2001). Then Contramid[®] is

phagocytosed by macrophages (Artursson et al., 1987a) and dissolved presumably by the action of α -glucosidases in the lysosomal compartment (Artursson et al., 1984). However Contramid[®] absorption is only a hypothesis and should be verified in further studies.

Healing appeared as soon as one week after implantation of Contramid[®] with the proliferation of thin intra-implant fibrovascular septa. The foreign-body reaction is usually determined by the form and topography of the surface of the implant (Anderson, 1994). With Contramid[®], the foreign-body reaction was mainly composed of macrophages. A few giant cells appeared on day 180 and the connective tissue around pellets was always well-vascularized and loose. Contramid[®] pellets obtained by powder compaction are porous and show a high surface to volume ratio. A high polymer porosity usually induces high ratios of macrophages and low fibrosis (Mohanty et al., 1992; Anderson, 1994). If this porosity is optimal it may allow a better vascular invasion of the polymer (Salzmann et al., 1997; Sharkawy et al., 1998). Mild fibrosis and neovascularization with Contramid[®] would enable a relatively efficient drug diffusion (Sharkawy et al., 1997) and plasma-tissue exchange (Sharkawy et al., 1998), respectively. The transport barrier between Contramid[®] implant and host appears to be limited.

Biofunctionality of Contramid[®] as a parenteral drug delivery device has also been demonstrated in the present study. Indeed for the first time an active peptide has been released from Contramid[®] pellets implanted subcutaneously. Absence of clinical host reaction and *in vivo* active peptide release with Contramid[®] implants are in agreement with the good biotolerance and the restrictive fibrosis previously observed in mice.

A significant time effect on IGF-I concentrations for both Contramid[®] treatments reflected an exogenous GRF action at the pituitary level via a GH stimulation. Growth hormone directly or indirectly through IGF-I decreases lipogenesis and promotes protein accretion resulting in enhanced growth in food producing animals such as swine (Dubreuil et al., 1990). Efficiency of gain through decreased feed consumption but no increased rate

of gain has been observed in pigs with subcutaneous administration of porcine-GH loaded implants (Klindt et al., 1995). Exogenous delivery profile of GH has been shown to have its biological importance. A GH pulsatile release device with an adequate frequency to achieve the physiological GH release as produced by the pituitary gland might be expensive and burdensome to develop for animal production application. However long-term injection of a potent analog of GRF increased average daily gain, reduced food intake and improved feeding efficiency in swine (Dubreuil et al., 1990). A continuous administration of GRF over an extended period of time is likely to be more appropriate since GH physiological cycle is preserved. Indeed under these conditions, an increased GH peak amplitude has been reported in pigs (Dubreuil et al., 1991) as well as an increased GH peak frequency in humans (Vance et al., 1989; Corpas et al., 1993b) both resulting in an increase of GH secretion and IGF-I concentration during GRF treatment.

IGF-I concentration profiles over time were not statistically different between the two Contramid[®] groups. Thus, Contramid[®] is a polymeric carrier characterized *in vivo* by a good robustness to Hex-hGRF loading level. Inversely PLGA microspheres administered subcutaneously to swine were characterized by a definite response depending on loading level of an analog of natural porcine GRF (pGRF) (Thompson et al., 1997).

The present study demonstrates that initial burst as observed with pure Hex-hGRF implants has been significantly controlled with addition of Contramid[®] providing a safe IGF-I concentration plateau. However Hex-hGRF activity time of ten days on IGF-I concentration was not extended with Contramid[®] implants since no significant difference was detected among the three implant treatments on day 14 and no recurrent IGF-I increase was observed thereafter. All animals were given the same dose of Hex-hGRF (15 mg) but its bioavailability estimated via IGF-I area under the curve is different between pure Hex-hGRF and Contramid[®] treatments. Since active period was similar for all groups it is therefore hypothesized that *in vivo* some Hex-hGRF was lost in the Contramid[®] implants due to instability of the peptide. Similarly neither the dose nor the loading level of an

analog of pGRF in PLGA microsphere formulation had an effect on the duration of response in swine where the observed activity also lasted only 9 to 12 days (Thompson et al., 1997).

2.1.7. Conclusions

For the first time Contramid[®] implants were tested *in vivo*. It was demonstrated that this polymer is well tolerated with an excellent biocompatibility. Macroscopic examination following implantation revealed a mild inflammatory reaction always strictly limited to the implantation site. Microscopically, it has been shown that Contramid[®] is degraded and eventually phagocytosed by macrophages. Development of a mild peripheral fibrosis and an intra-implant neovascularization suggested firstly a limited transport barrier between implant and host and secondly a possible diffusion of a drug from the polymer matrix, respectively.

This study also demonstrates the *in vivo* diffusion of an active peptide from Contramid[®] matrix. Contramid[®] biofunctionality as a systemic drug delivery device after implantation is therefore established. During all the Hex-hGRF activity period, the delivery was controlled with Contramid[®] enabling increased IGF-I concentrations within a safe range which has been reported to improve carcass quality in meat animals. The Contramid[®] implant concept could be appropriate for this purpose but the issue of Hex-hGRF stability issue has to be resolved first.

More generally, Contramid[®] implantation concept may be used for various site-specific applications in the future. Such drug delivery systems have several advantages compared to conventional drug therapies (Langer, 1990): 1) Absence of drug concentration peaks and troughs; 2) drug delivery to a particular body compartment at an adequate concentration; 3) protection for drugs rapidly degraded; 4) increase of drug efficacy and patient compliance and 4) decrease of treatment cost.

2.1.8. Acknowledgements

We wish to thank Dr Paul Brazeau and his team of Centre Hospitalier Universitaire de Montreal (CHUM), Notre-Dame campus, Quebec, Canada, for their technical assistance and Theratechnologies inc., Quebec, Canada, for the supply of Hex-hGRF.

2.1.9. References

- Abribat, T., Lapierre, H., Dubreuil, P., Pelletier, G., Gaudreau, P., Brazeau, P., Petitclerc, D., 1990. Insulin-like growth factor-I concentration in Holstein female cattle: variations with age, stage of lactation and growth hormone-releasing factor administration. *Domest. Anim. Endocrin.* 7, 93-102.
- Anderson, J.M., Miller, K.M., 1984. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 5, 5-10.
- Anderson, J.M., 1994. Inflammation and the foreign body response. *Probl. Gen. Surg.* 11, 147-160.
- Artursson, P., Arro, E., Edman, P., Ericsson, J.L.E., Sjöholm, I., 1987a. Biodegradable microspheres V: stimulation of macrophages with microparticles made of various polysaccharides. *J. Pharm. Sci.* 76, 127-133.
- Artursson, P., Edman, P., Sjöholm, I., 1984. Biodegradable microspheres I: duration of action of dextranase entrapped in polyacrylstarch microparticles *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231, 705-712.
- Artursson, P., Edman, P., Ericsson, J.L.E., 1987b. Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. *Scand. J. Immunol.* 25, 245-254.
- Björk, E., Edman, P., 1988. Degradable starch microspheres as a nasal delivery system for insulin. *Int. J. Pharm.* 47, 233-238.
- Björk, E., Edman, P., 1990. Characterization of degradable starch microspheres as a nasal delivery system for drugs. *Int. J. Pharm.* 62, 187-192.

- Björk, E., Bjurström, S., Edman, P., 1991. Morphologic examination of rabbit nasal mucosa after nasal administration of degradable starch microspheres. *Int. J. Pharm.* 75, 73-80.
- Callens, C., Remon, J.P., 2000. Evaluation of starch-maltodextrin-Carbopol® 974 P mixtures for nasal delivery of insulin in rabbits. *J. Control. Rel.* 66, 215-220.
- Corpas, E., Harman, S.M., Blackman, M.R., 1993a. Human growth hormone and human aging. *Endocr. Rev.* 14, 20-39.
- Corpas, E., Harman, S.M., Piñeyro, M.A., Roberson, R., Blackman, M.R., 1992. Growth hormone (GH)-releasing hormone-(1-29) twice daily reverses the decreased GH and insulin-like growth factor-I levels in old men. *J. Clin. Endocr. Metab.* 75, 530-535.
- Corpas, E., Harman, S.M., Piñeyro, M.A., Roberson, R., Blackman, M.R., 1993b. Continuous subcutaneous infusions of growth hormone (GH) releasing hormone 1-44 for 14 days increase GH and insulin-like growth factor-I levels in old men. *J. Clin. Endocr. Metab.* 76, 134-138.
- Dakhil, S., Ensminger, W., Cho, K., Niederhuber, J., Doan, K., Wheeler, R., 1982. Improved regional selectivity of hepatic arterial BCNU with degradable microspheres. *Cancer* 50, 631-635.
- Dubreuil, P., Pelletier, G., Petitclerc, D., Lapierre, H., Couture, Y., Morisset, J., Gaudreau, P., Brazeau, P., 1987. Influence of age and sex on basal secretion of growth hormone (GH) and on GH-induced release by porcine GH-releasing factor pGRF(1-29)NH₂ in growing pigs. *Domest. Anim. Endocrin.* 4, 299-307.
- Dubreuil, P., Petitclerc, D., Gaudreau, P., Brazeau, P., Pelletier, G., 1991. Effect of growth hormone-releasing factor infusion on somatotropin, prolactin, thyroxine, insulin, insulin-like growth factor I and blood metabolites in control and somatostatin-immunized growing pigs. *Domest. Anim. Endocrin.* 8, 307-321.
- Dubreuil, P., Petitclerc, D., Pelletier, G., Gaudreau, P., Farmer, C., Mowles T.F., Brazeau, P., 1990. Effect of dose and frequency of administration of a potent analog of

- growth hormone-releasing factor on hormone secretion and growth in pigs. *J. Anim. Sci.* 68, 1254-1268.
- Foster, T.P., 1999. Somatotropin delivery to farmed animals. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 38, 151-165.
- Forsberg, J.O., 1978. Transient blood flow reduction induced by intra-arterial injection of degradable starch microspheres. *Acta Chir. Scand.* 144, 275-281.
- Gomel, V., McComb, P., Boer-Meisel, M., 1980. Histologic reactions to polyglactin-910, polyethylene and nylon microsuture. *J. Reprod. Med.* 25, 56-59.
- Illum, L., Farraj, N., Critchley, H., Davis, S.S., 1988. Nasal administration of gentamicin using novel microsphere delivery system. *Int. J. Pharm.* 46, 261-265.
- Klindt, J., Buonomo, F.C., Yen, J.T., Baile, A., 1995. Growth performance, carcass characteristics, and sensory attributes of boars administered porcine somatotropin by sustained-release implant for different lengths of time. *J. Anim. Sci.* 73, 3585-3595.
- Klindt, J., Yen, J.T., Buonomo, F.C., Roberts, A.J., Wise, T., 1998. Growth, body composition, and endocrine responses to chronic administration of insulin-like growth factor I and(or) porcine growth hormone in pigs. *J. Anim. Sci.* 76, 2368-2381.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a novel growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.
- Laakso, T., Artursson, P., Sjöholm, I., 1986. Biodegradable microspheres IV: factors affecting the distribution and degradation of polyacryl starch microparticles. *J. Pharm. Sci.* 75, 962-966.
- Langer, R., 1990. New methods of drug delivery. *Science* 249, 1527-1533.
- Lenaerts, V., Dumoulin, Y., Mateescu, M.A., 1991. Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *J. Control. Rel.* 15, 39-46.

- Lenaerts, V., Moussa, I., Dumoulin, Y., Mebsout, F., Chouinard, F., Szabo, P., Mateescu, M.A., Cartilier, L., Marchessault, R., 1998. Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. *J. Control. Rel.* 53, 225-234.
- Mohanty, M., Hunt, J.A., Doherty, P.J., Annis, D., Williams, D.F., 1992. Evaluation of soft tissue response to a poly(urethane urea). *Biomaterials* 13, 651-656.
- Moussa, I.S., Cartilier, L.H., 1996. Characterization of moving fronts in cross-linked amylose matrices by image analysis. *J. Control. Rel.* 42, 47-55.
- Moussa, I.S., Lenaerts, V., Cartilier, L.H., 1998. Image analysis studies of water transport and dimensional changes occurring in the early stages of hydration in cross-linked amylose matrices. *J. Control. Rel.* 52, 63-70.
- Neff, M.R., Holtz, G.L., Betsill, W.L., 1985. Adhesion formation and histologic reaction with polydioxanone and polyglactin suture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151, 20-23.
- Preston, R.L., 1999. Hormone containing growth promoting implants in farmed livestock. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 38, 123-138.
- Rahmouni, M., Chouinard, F., Nekka, F., Lenaerts, V., Leroux, J.C., 2001. Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on *in vitro* release of sodium diclofenac. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51,191-198.
- Salzmann, D.L., Kleinert, L.B., Berman, S.S., Williams, S.K., 1997. The effects of porosity on endothelialization of ePTFE implanted in subcutaneous and adipose tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* 34, 463-476.
- Sharkawy, A.A., Klitzman, B., Truskey, G.A., Reichert, W.M., 1997. Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. I. Diffusion properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 37, 401-412.
- Sharkawy, A.A., Klitzman, B., Truskey, G.A., Reichert, W.M., 1998. Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. II. Plasma-tissue exchange properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 40, 586-597.

- Tannenbaum, G.S., 1990. Interrelationship of somatostatin and growth hormone-releasing hormone in the genesis of the rhythmic secretion of growth hormone. *Acta Paediatr. Scand.* 367, 76-80.
- Thompson, W.W., Anderson, D.B., Heiman, M.L., 1997. Biodegradable microspheres as a delivery system for rismorelin porcine, a porcine-growth-hormone-releasing-hormone. *J. Control. Rel.* 43, 9-22.
- Tizard, I.R., 1996. Inflammation. In: Tizard, I.R. (Ed.), *Veterinary Immunology: An Introduction*, 5th Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 43-54.
- Vance, M.L., Kaiser, D.L., Martha, P.M., Furnaletto, R., Rivier, J., Vale, W., Thorner, M.O., 1989. Lack of *in vivo* somatotroph desensitization or depletion after 14 days of continuous growth hormone (GH)-releasing hormone administration in normal men and GH-deficient boy. *J. Clin. Endocr. Metab.* 68, 22-28.

2.2. Article 2 : Evaluation of tissue reaction and biodegradation of implanted cross-linked high amylose starch in rats

Cyril Désévaux^{1,3}, Pascal Dubreuil², Vincent Lenaerts³, Christiane Girard²

¹Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Montreal, Qc, H3C 3J7, Canada

²Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qc, J2S 7C6, Canada

³Labopharm inc., 1208 rue Bergar, Laval, Qc, H7L 5A2, Canada

Correspondence to: Cyril Désévaux, Labopharm inc., 1208 Bergar, Laval, Qc, H7L 5A2, Canada. Tel.: + 450-629-7776; fax: + 450-663-1555. E-mail: cyril.desevaux@umontreal.ca

Reprinted from *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)* 63 : 772-779, © Copyright (2002), with permission from Wiley Periodicals, Inc..

2.2.1. Abstract

The biocompatibility and degradation characteristics of cross-linked high amylose starch (Contramid[®]) were investigated in rats over 4 months. Contramid[®] pellets (3-mm diameter and thickness) obtained by direct compression, were implanted subcutaneously and intramuscularly. On sequential time points, macroscopic observations of implantation sites were performed and tissue samples were removed, fixed and histologically evaluated. No macroscopic inflammatory reaction was observed with Contramid[®]. Upon histologic examination, inflammatory reaction produced by Contramid[®] was moderate and restricted

to implantation sites. The sequence of inflammatory events with Contramid[®] was similar regardless of implantation site. Degradation of Contramid[®] pellets was characterized by fragmentation with formation of fibrovascular septa and phagocytosis by macrophages. Finally Contramid[®] was mostly absorbed by the end of the four-month period and substituted by adipocytes. It has been demonstrated that Contramid[®] is a biocompatible and absorbable material.

2.2.2. Keywords

Cross-linked starch implant; Biocompatibility; Biodegradation, Tissue reaction, Rats

2.2.3. Introduction

Nowadays few degradable materials used as implants for biomedical applications and more particularly drug delivery systems are available like poly(esters), poly(orthoesters) and poly(anhydrides).¹⁻³ Implantation of drug delivery systems provides several advantages compared to conventional drug therapies:⁴ 1) they avoid peaks and troughs of drug concentrations associated with conventional injections; 2) they provide localized drug delivery to a particular body compartment at an adequate concentration lowering the systemic drug level and the potential drug toxicity; 3) they protect drugs that are rapidly degraded and 4) they improve drug efficacy and patient compliance. Moreover when the drug carrier is biodegradable, it has the advantage to circumvent an additional surgery for the removal of the drug-depleted matrix. Finally a biodegradable polymeric drug delivery system significantly decreases the cost of treatment.

In addition to the biofunctionality issue, one important prerequisite of an implant is its biocompatibility. This is characterized by the intensity of acute and chronic inflammatory responses and the degree of fibrosis over various periods of time after

implantation.^{5,6} Histologic evaluation of the interaction between the implant and the adjacent tissues as a function of time, is a method of choice to characterize the biocompatibility of biomaterials including drug delivery implants.⁷

Cross-linked high amylose starch (Contramid[®]) is a water insoluble polymer used to manufacture hydrophilic swelling matrices. Contramid[®] was firstly developed for controlled release solid oral dosage forms with a quasi zero order drug release over 12 to 24 hours.^{8,9} Moreover it has been recently demonstrated that subcutaneous Contramid[®] implants are very well tolerated and have controlled delivery properties.¹⁰ These results are in accordance with the good biocompatibility shown when starch microspheres are administered nasally in rabbits¹¹ and arterially in humans.¹²

The present study was initiated to further investigate the biocompatibility and the biodegradation of Contramid[®]. Following subcutaneous and intramuscular implantations, tissue response and *in vivo* degradation of Contramid[®] were evaluated at different time points.

2.2.4. Materials and methods

2.2.4.1. Experimental animals

Forty-two Sprague-Dawley male rats weighing 260-290 g at the time of implantation were used in this study. The animals were individually housed in cages with free access to food pellets (5075-U.S. Charles River Rodent, Charles River Canada, Qc, Canada) and drinking water and were on a 14/10 h light/dark cycle with a room temperature maintained at 20 °C.

2.2.4.2. Implants

Dry blends of cross-linked high amylose starch with 16 % of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) were compressed to obtain 3-mm pellets as previously described.¹⁰ Contramid[®] implants were then sterilized by gamma irradiation (5 kGy).

2.2.4.3. Implantation procedure

Rats were anesthetized by intramuscular administration of ketamine hydrochloride (Rogarsetic[®], Rogar/STB inc., Ontario, Canada) (60 mg/kg BW) and xylazine (Rompun[®], Bayer inc., Ontario, Canada) (6 mg/kg BW) given in the left quadriceps femoris region.

The lumbar region and the lateral right limb were shaved and implantation sites were aseptically prepared following the standard surgical procedure. The same surgeon performed all implantations.

A single 1-cm midline incision was made on the back of the animals. By blunt dissection, two 5-cm subcutaneous lateral tunnels were made cranially away from the incision. One site served as a sham control for evaluation of the influence on tissue response of the 5-cm subcutaneous tunnel formed to introduce implants. Each animal was implanted subcutaneously with one Contramid[®] pellet using a 3.2-mm diameter trocar through the other subcutaneous tunnel. A Contramid[®] implant was intramuscularly inserted with the same previously described trocar in the quadriceps muscle. The skin was then closed with interrupted non-absorbable monofilament nylon sutures (3-0 Ethilon[®], Ethicon inc., Ontario, Canada).

The rats were clinically monitored and the implantation sites observed for local inflammatory reaction (edema, redness, heat and pain) until euthanasia.

All animal procedures performed were approved by the animal welfare and ethics committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, which follows the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.¹³

2.2.4.4. Macroscopic examination

Six rats were euthanized by carbon dioxide asphyxiation at seven specific time points after implantation: 3, 7, 14 days and 1, 2, 3, 4 months. The lumbodorsal skin was resected to expose subcutaneous implantation sites. The quadriceps muscle was isolated and transversally sliced at 4 to 5 mm intervals to locate the intramuscular Contramid[®] implant. Each implantation site was examined and macroscopic observations recorded. All implants with surrounding tissues were excised *en bloc* for histologic processing.

2.2.4.5. Histology

Specimens were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and were sectioned in the middle of Contramid[®] implants. Then they were routinely embedded in paraffin and cut at 4 μm and sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Additional sections with subcutaneous and intramuscular Contramid[®] from two animals at each time point were stained with periodic acid-Schiff (PAS) stain coloring Contramid[®] magenta¹⁰, by immunoperoxidase (IP) technique with muramidase as antibody coloring macrophages brown and with reticulin stain (Gomori's method)¹⁴ coloring reticulin fibers black. In addition, frozen sections of subcutaneous Contramid[®] implants were stained with oil red-O (ORO) method for detection of lipids.¹⁵ The slides were examined by two independent investigators (CD, CG) by light microscopy. The quantity and the nature of inflammatory cells as well as the healing process were evaluated. Tissue response was assessed by a modification of methods described by Sewell¹⁶ and Jansen.⁵ Density of inflammatory reaction was graded according to the degree of cells infiltration as previously

reported:^{10,17,18} 0, no infiltrate; 1, minimal infiltrate; 2, moderate infiltrate; and 3, marked infiltrate.

2.2.5. Results

2.2.5.1. Clinical monitoring and macroscopic observations

Clinically, no adverse effect was noted during the post-implantation period. Macroscopic examination at each time point did not reveal any significant inflammatory reaction for both Contramid[®] implantation sites. On day 3, fibrin was observed at all subcutaneous implantation sites including sham causing occasionally a very slight adherence to neighbouring tissues. From day 7, subcutaneous Contramid[®] implants were surrounded by a very thin fibrous capsule that did not tend to be thicker over time. While implants were progressively absorbed, they appeared first as solid swelled pellets then as soft gel pellets on days 3 and 7, respectively. Then, they became difficult to observe over time but the refringent aspect of the surrounding connective tissue and a very small fibrous scar could reveal the implantation sites.

2.2.5.2. Histologic examination

The histologic response to implanted Contramid[®] is summarized in Table 1. Implantation sites were retrieved in all animals except in one rat at month 1 and another one at month 4. A minimal acute inflammatory reaction with few polymorphonuclear cells (PMNs) and macrophages characterized host reaction at the sham site over the first seven days.

2.2.5.2.1. Subcutaneous Contramid® implants

The inflammatory reaction was uniform in all animals and always restricted to implantation sites.

Table 1 : Histologic reaction grade score to implanted Contramid®. 0 = no infiltrate; 1 = minimal infiltrate; 2 = moderate infiltrate; 3 = marked infiltrate. PMN = polymorphonuclear cells; M = macrophages; GC = multinucleated giant cells; L = lymphocytes.

Days	PMN	M	GC	L
3	3	3	0	2
7	2	3	1	3
14	1	3	1	1
28	1	3	1	1
60	0	3	1	1
90	1	2	1	1
120	0	2	1	1

On days 3 and 7 after implantation (Fig. 1a), the inflammatory reaction was characterized by focal infiltrates of PMNs in the pellet. Macrophages and some lymphocytes were localized at the peripheral part of the pellet. A slight fibroblastic proliferation and a fibrinous network sometimes surrounded the implants. The pellet was partially fragmented. Large non-cellular areas were filled with PAS positive material corresponding to the polymer (Fig. 2a). Particularly on day 3, reticulin stain revealed a stroma compression surrounding the implantation site. On day 7, some thin reticulin fibers were observed in the peripheral part of Contramid® implants.

On day 14 after implantation (Fig. 1b), PMNs tended to degenerate and decrease in number. Mononuclear cells with an abundant spumous cytoplasm denoting a phagocytic activity invaded the polymer. These cells were positively stained for muramidase by IP (Fig. 3a) and corresponded to macrophages. Thin fibrovascular septa subdivided the implants and a loose peripheral well-vascularized connective tissue was present around the implantation sites. Both structures were positive with reticulin stain. Free polymer was progressively less abundant and more fragmented.

One month after implantation (Fig. 1c), phagocytic macrophages were the predominant inflammatory cells and invaded almost all the implant area. Few multinucleated giant cells were present. The intracellular proportion of PAS positive material was enhanced. Fibrovascular septa developed progressively with thin reticulin fibers subdividing the implants. The connective tissue surrounding the implants was still thin. Adipocytes containing cytoplasmic ORO-positive vacuoles were found in small clusters between macrophages.

Two months after implantation (Fig. 1d), spumous macrophages reached the center of the implant site with no more free material left. All PAS staining was intracellular. The implant site also contained an increasing number of thin fibrovascular septa and adipocytes. Fibrosis around implantation sites was minimal and thin reticulin fibers were still present within the implants (Fig. 3b).

Three months after implantation (Fig. 1e), the amount of PAS-positive material started to decrease (Fig. 2b) as well as the number of macrophages. Simultaneously the number of adipocytes increased. Implant size decreased markedly and the shape was altered by fibrovascular septa formation. However the number of reticulin fibers was similar compared to previous observations. The implantation site was still evident.

Four months after implantation (Fig. 1f), the implantation site contained some residual macrophages and large areas of adipocytes. The total PAS-positive material was

reduced or non-existent while ORO-stained areas increased in size. Some multinucleated giant cells and lymphocytes were observed. Fibrosis remained mild since the number of reticulin fibers remained constant and even tended to decrease.

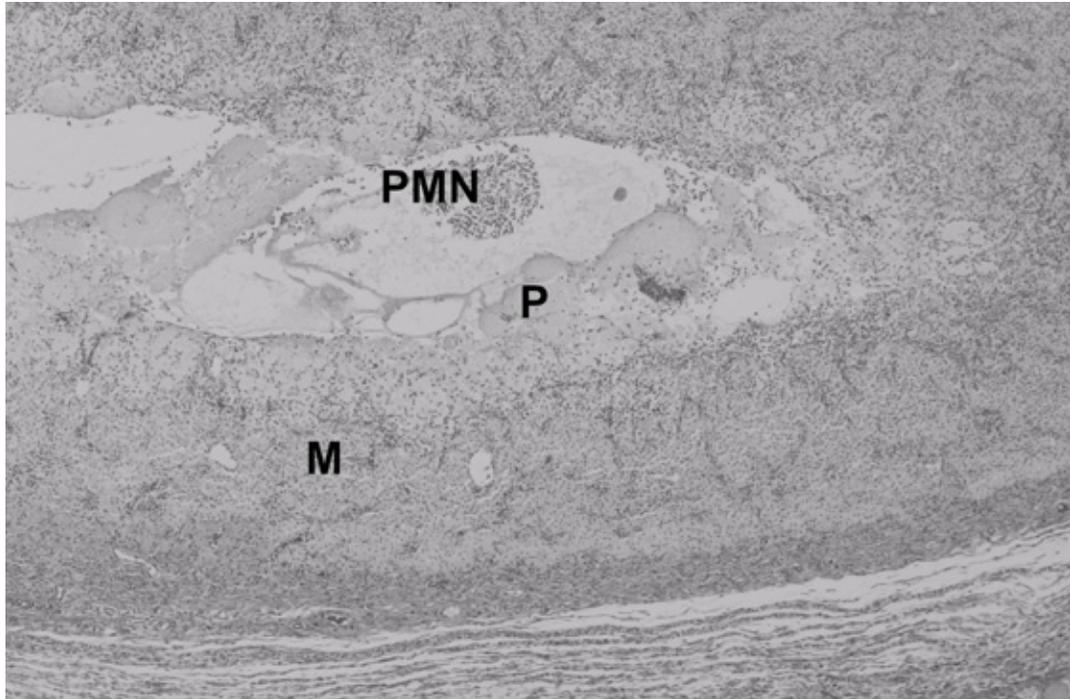


Fig.1a

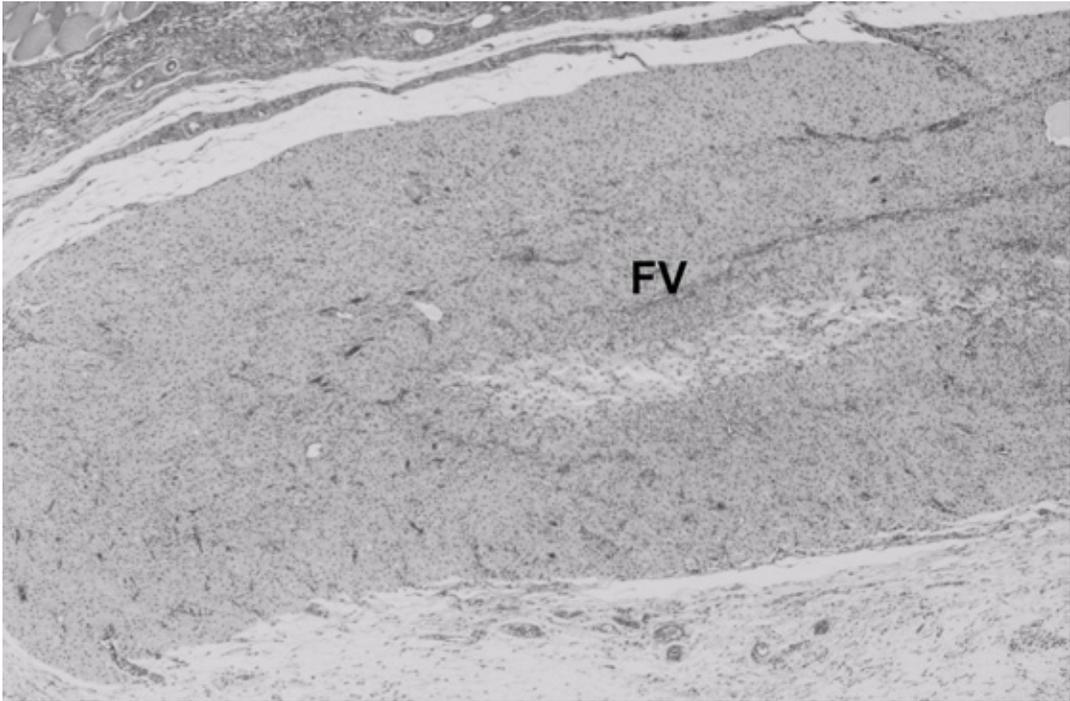


Fig.1b

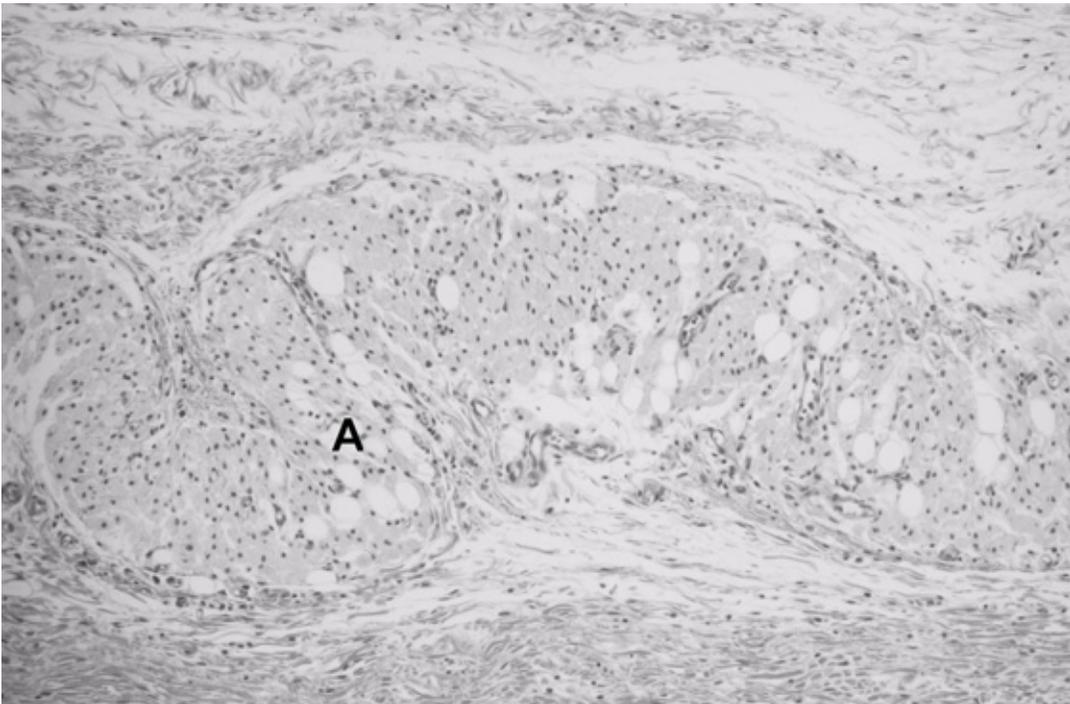


Fig.1c

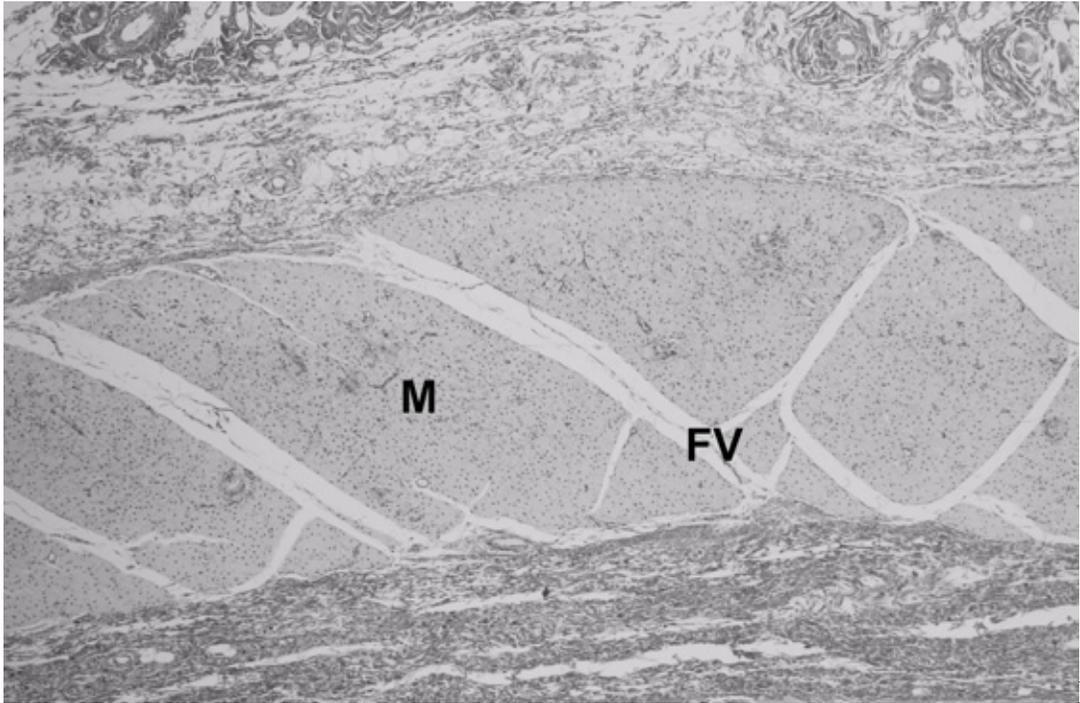


Fig.1d

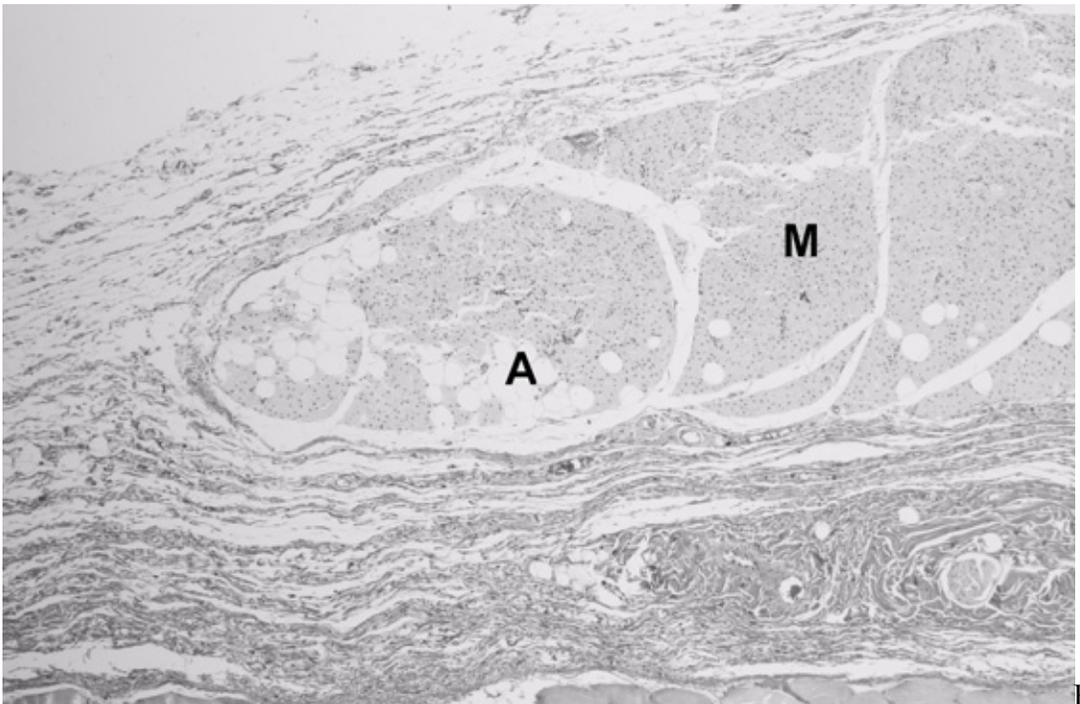


Fig. 1e

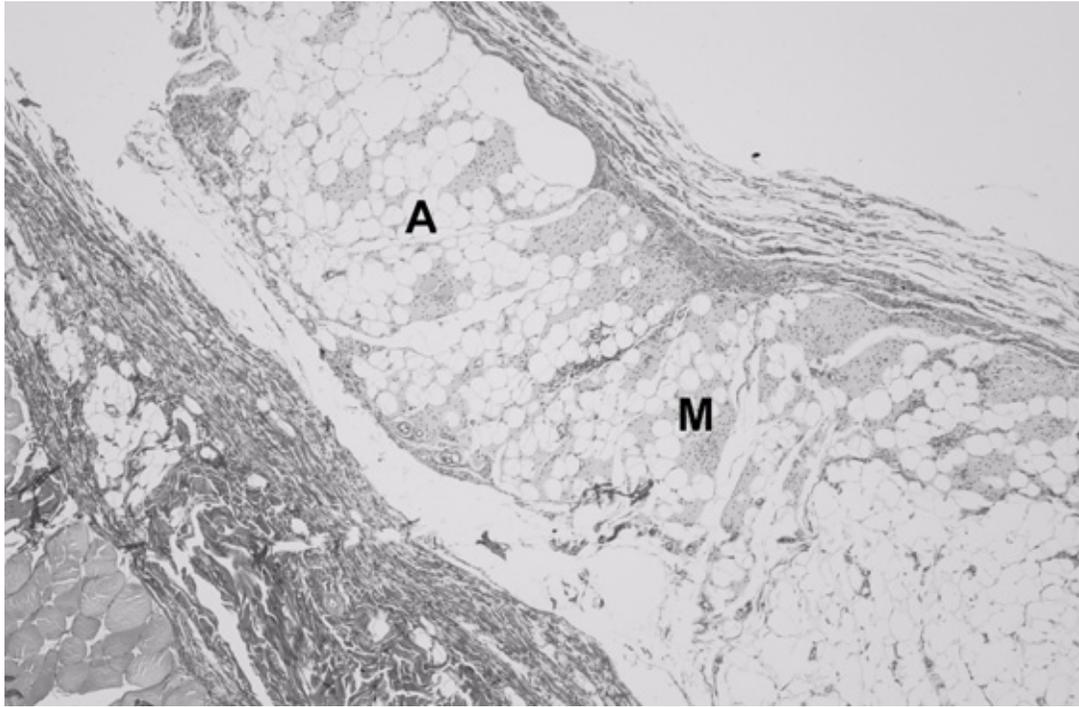


Fig.1f

Figure 1 : Micrographs of rat subcutaneous tissue response to Contramid[®] (Hematoxylin Eosin Saffron) : a) seven days after implantation, polymorphonuclears (PMN) arranged in small groups infiltrate the implant whereas macrophages (M) are located around polymer (P) (Original magnification = 40 x); b) fourteen days after implantation, fibrovascular septa (FV) develop within the implant (Original magnification = 40 x); c) one month after implantation, few adipocytes (A) appear (Original magnification = 100 x); d) two months after implantation, the implant site is completely infiltrated by macrophages (M) grouped in pseudo-lobules by fibrovascular septa (FV) (Original magnification = 40 x); e) three months after implantation, macrophages (M) are less numerous whereas the number of adipocytes (A) increases (Original magnification = 40 x); f) four months after implantation, few macrophages (M) remain among adipocytes (A) (Original magnification = 40 x).

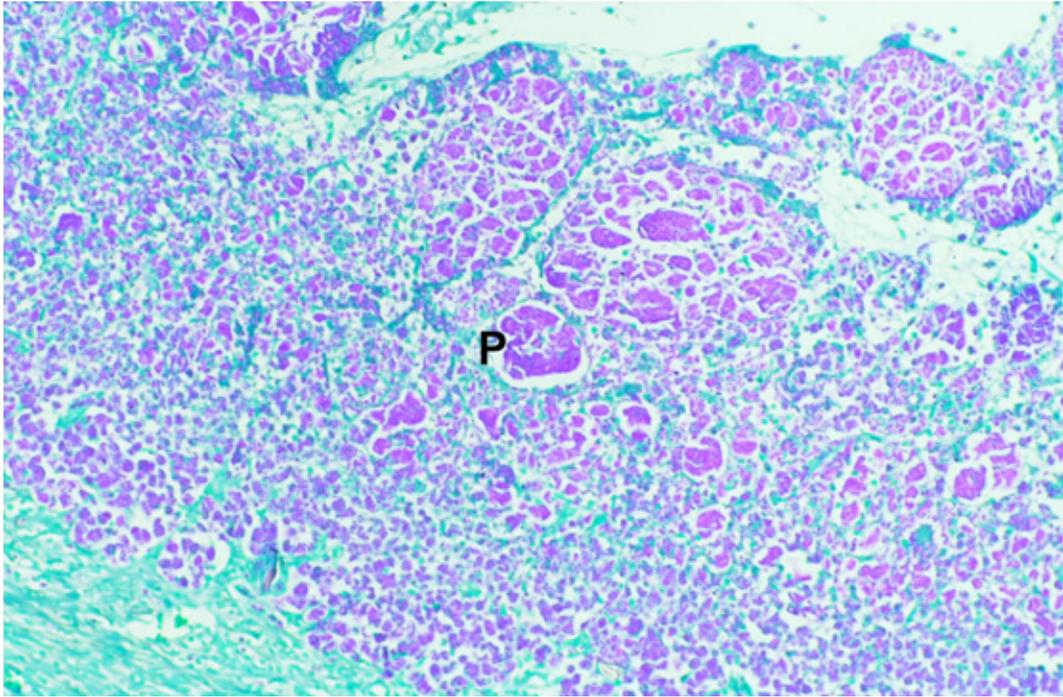


Fig. 2a

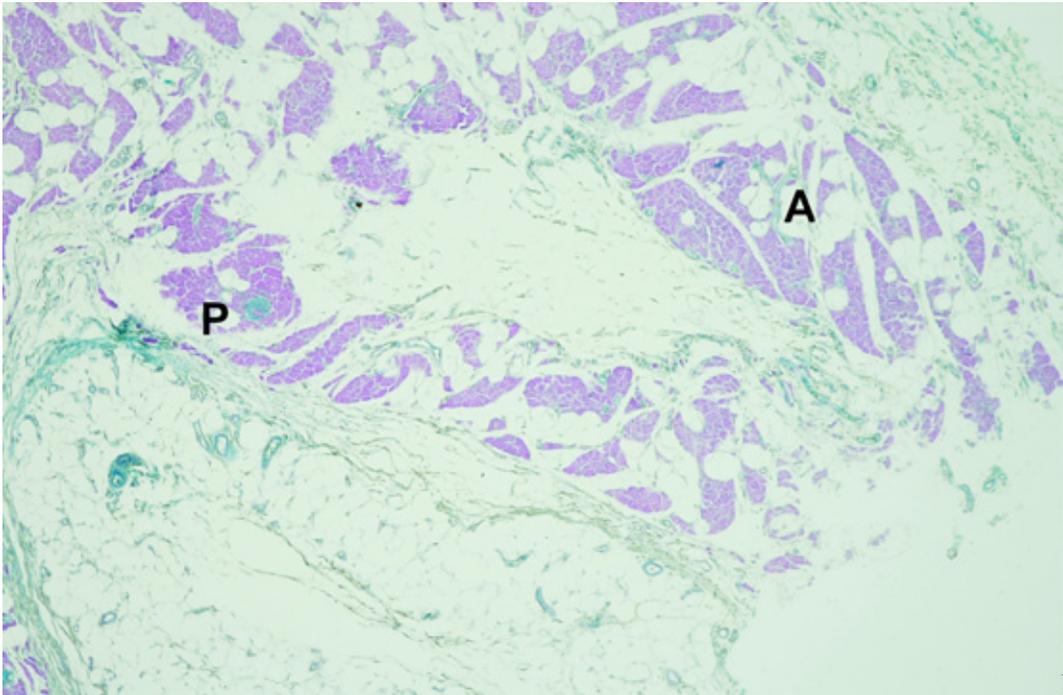


Fig. 2b

Figure 2 : Micrographs of rat subcutaneous tissue response to Contramid[®] (periodic acid-Schiff) : a) one week after implantation, revealed polymer (P) is mainly extracellular

(Original magnification = 100 x); b) three months after implantation, the polymer (P) in decreased amounts is intracellular and adipocytes (A) in clusters are present (Original magnification = 40 x).

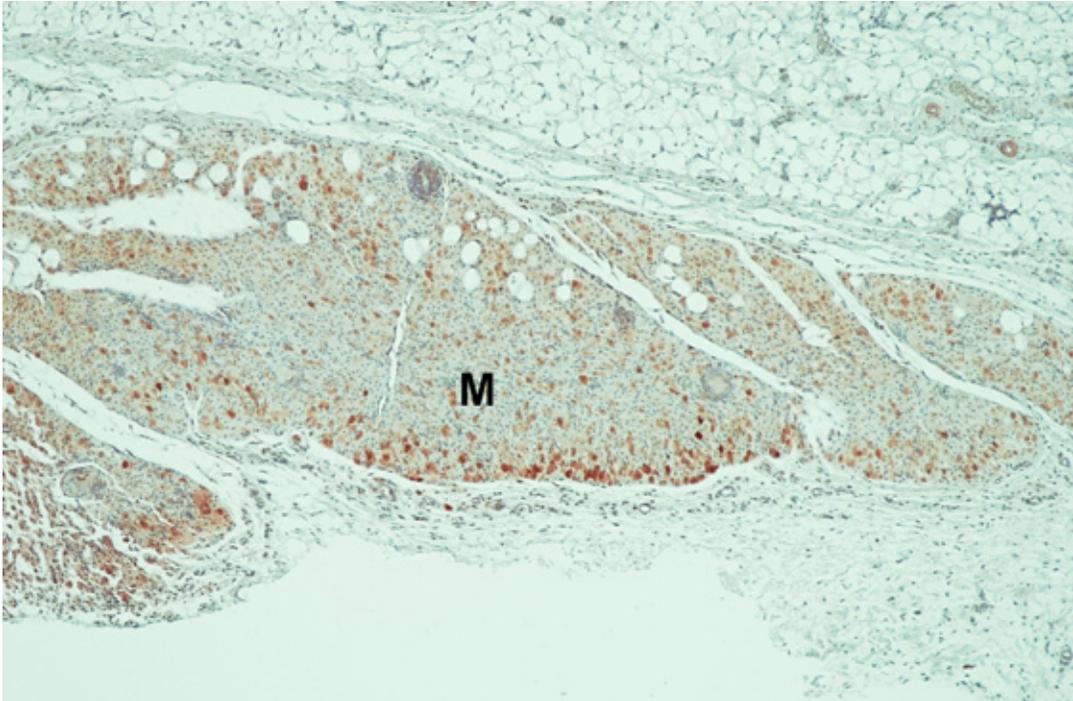


Fig. 3a

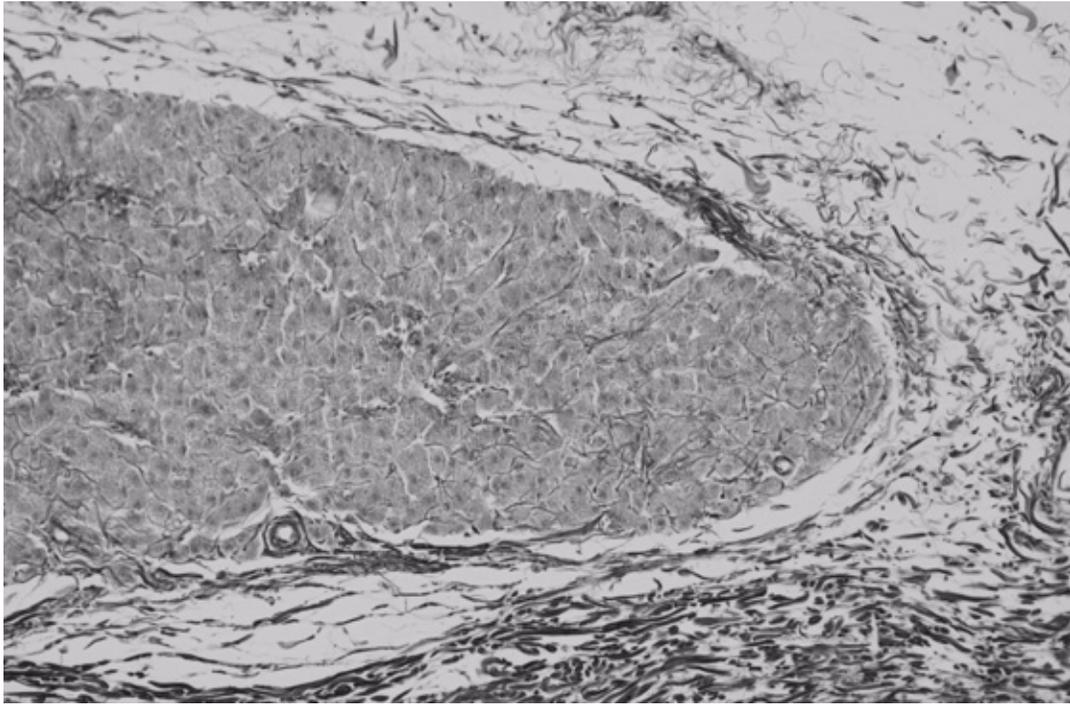


Fig. 3b

Figure 3 : Micrographs of rat subcutaneous tissue response to Contramid[®] two months after implantation: a) macrophages are colored brown (immunoperoxidase) and correspond to PAS positive areas (Original magnification = 40 x); b) fibrovascular septa and a loose peripheral fibrous tissue are composed of thin fibers colored with reticulin stain (Original magnification = 100 x).

2.2.5.2.2. *Intramuscular Contramid[®] implants*

Host reaction with intramuscular Contramid[®] was similar to that observed with subcutaneous Contramid[®] (Table 1). A mild muscle necrosis and some focal hemorrhages were observed at the implantation site on day 3 (Fig. 4a). However evident muscular regeneration was noted on days 3 and 7 (Fig. 4b). Stroma compression revealed by reticulin stain around Contramid[®] implants was more evident in muscle on day 3. Degradation and absorption of Contramid[®] tended to be longer intramuscularly than subcutaneously. A

slightly more important amount of positive PAS material was recorded in muscle than in subcutaneous tissue four months after implantation.

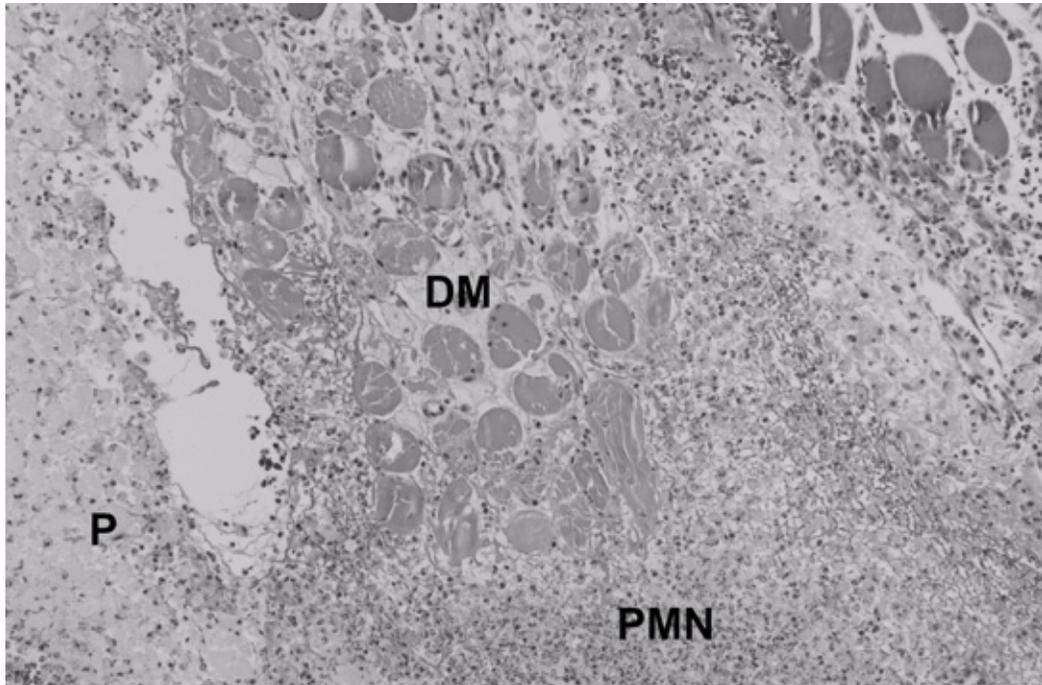


Fig. 4a

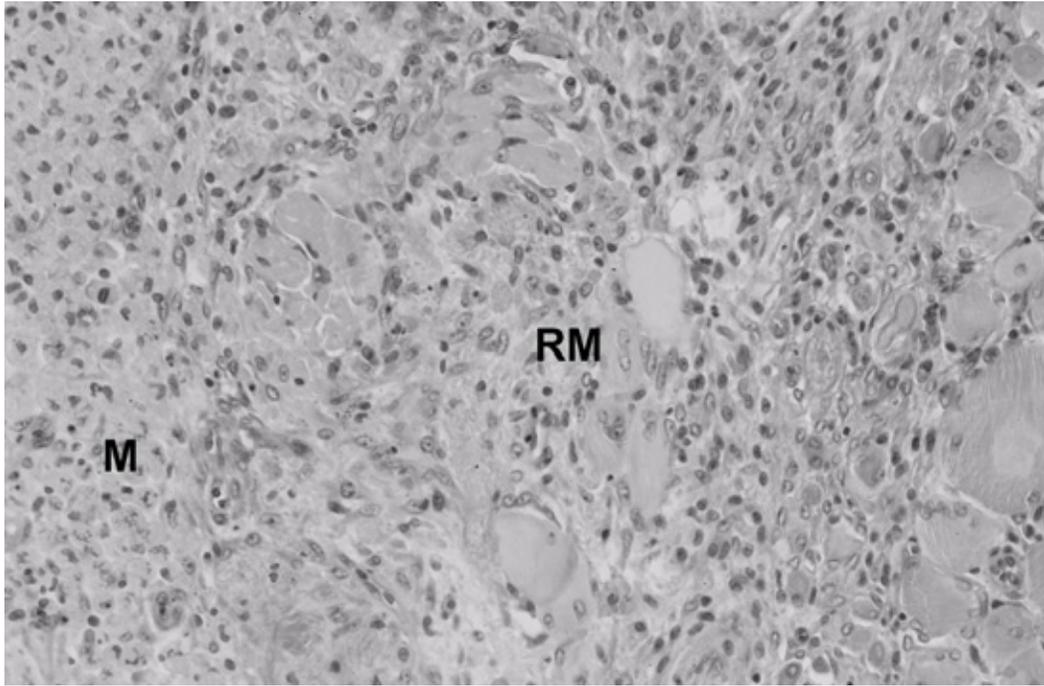


Fig. 4b

Figure 4 : Micrographs of rat intramuscular tissue response to Contramid[®] (Hematoxylin Eosin Saffron) : a) three days after implantation, some myocytes are degenerating (DM). Polymer (P). Polymorphonuclears (PMN) (Original magnification = 100 x); b) seven days after implantation, regenerating myocytes (RM) are observed. Macrophages (M) (Original magnification = 200 x).

2.2.6. Discussion

In the present study, an excellent biocompatibility of cross-linked high amylose starch has been shown in rats. Indeed, subcutaneous implantation with histological examination of inflammatory and healing processes as a function of time can determine the *in vivo* biocompatibility of implantable delivery systems.⁷ Results observed in rats in the present study are in accordance with our previous work in mice.¹⁰ Moreover this study demonstrates for the first time that Contramid[®] is an absorbable material when implanted subcutaneously and intramuscularly. By four months, only a small residual scar was

apparent macroscopically and positive PAS material decreased significantly over time to a quasi-complete disappearance on histologic examination.

It has been shown that host reaction, healing process and biodegradation of Contramid[®] were similar regardless of implantation site. Similarly in rabbits¹⁹ and rats²⁰, no differences in degradation were observed between subcutaneous and intramuscular polylactide implants.

Since the inflammatory reaction at the sham site was short-lived and minimal, the subcutaneous trauma caused by the surgery was not significant. It may not be the case intramuscularly considering the transient muscle cell degenerescence. Contramid[®] implantation in mice has been previously reported to produce a less severe early reaction than skin incision and closure with suture material.¹⁰ For this reason, the sham site did not include the incision site in the present study. Non absorbable nylon was selected for skin sutures because of its lower reaction²¹ in order to not interfere with host response at implantation sites. For the same purpose of limiting the possible interaction between the surgical wound and implantation sites, a single skin incision and 5-cm subcutaneous tunnels were performed to minimize the number of wounds and to have a sufficient distance from incision.

In the days following the implantation, clinical monitoring did not reveal any adverse systemic reaction or local inflammation at any implantation site. Upon macroscopic examination, inflammatory reaction to Contramid[®] in subcutaneous rat tissue was not apparent contrarily to the neovascularization and fibrosis observed in mice.¹⁰

Microscopically, the sequence of events observed with implanted Contramid[®] in rats was similar to that previously described in mice.¹⁰ Host reaction to Contramid[®] described herein is in accordance with the main phases of inflammatory and foreign body responses to injuries caused by implanted devices.^{6,7,22,23} 1) an acute phase (1st week) characterized by a tissue fluid exudate and an accretion of PMN cell type; 2) a subacute

phase (2nd week) characterized by a progressive accumulation of macrophages and a proliferation of fibroblasts and endothelial cells; and 3) a chronic phase characterized by the implant degradation and the presence of few macrophages and/or giant cells. The evolution depends on the characteristics of the biomaterial leading to different degrees of degradation and/or encapsulation. Indeed, the chemical and physical properties of the material, the shape and size of the implant, the intensity of host response and the degree of trauma caused by implantation are factors which influence the absorption rate of a material.^{5-7,16,22,24} However, these successive general steps have been reported in previous studies with other polymers such as poly(esters), poly(anhydrides) and poly(orthoesters).^{18,25-28} All these various polymers are considered as absorbable biocompatible materials.

In accordance with the findings in mice¹⁰, a loose peripheral well-vascularized connective tissue developed around Contramid[®] implants, resulting in a minimal fibrosis. In parallel, thin fibrovascular septa subdivided early these implants. Similarly, an early fibrovascular tissue infiltration and a thin fibrous capsule developed with implants of porous polylactide and polyglycolide matrices²⁷ and their copolymers²⁹ in rats. Cross-linked high amylose starch matrix obtained from powder compaction, has been characterized as a porous material.^{30,31} After swelling, it has been demonstrated that Contramid[®] matrix remains porous and acts like a sponge through which water is able to flow under physical stress.³² Usually, implantation of a porous biomaterial does not induce a dense fibrous capsule^{22,33,34} and enables a better vascular invasion of the polymer bulk.³⁴⁻³⁶ Since collagenous encapsulation may impede the biofunctionality of implantable drug delivery systems, biocompatibility objectives are a diminution of the capsular thickness and an enhancement of angiogenesis around such devices.³⁴ Accordingly host response characteristics with Contramid[®] are favorable for usage of this polymer as a drug delivery implant.

Intracellular PAS stained material decreased over time thus denoting resorption of Contramid[®] after phagocytosis by macrophages. Other polysaccharides have been evaluated *in vivo* such as cellulose,³⁷ chitosan³⁸ and dextran.³⁹ Starch microspheres have also been used *in vivo* as a drug carrier; they had a good biocompatibility when administered nasally in rabbits¹¹ and they were characterized as a degradable material in humans when injected intra-arterially for the induction of a transient embolization.¹² Indeed starch microspheres have been shown to be degraded by α -amylase⁴⁰ and phagocytosed by macrophages.⁴¹⁻⁴³ Then they are likely dissolved by the action of α -glucosidases in the lysosomal compartment.^{44,45} Contramid[®] is possibly cleared up following a similar degradation pathway. Recently it has been demonstrated *in vitro* that Contramid[®] tablets are enzymatically degraded in the presence of α -amylase providing glucose, maltose and maltotriose as degradation products.⁴⁶ Active macrophages produce acid agents and enzymes that would initiate at the interface of the pellet an extracellular biodegradation process of starch by breaking down polymeric chains. When polysaccharidic fragments are small enough for phagocytosis, the polymer degradation would then be carried out in phagolysosomal vacuoles.

Contramid[®] was absorbed more rapidly in rats than in mice.¹⁰ This difference of absorption rates is thought to be mainly due to a variation of reaction between animal species as it has been reported previously with chromic gut between rat, rabbit and dog.¹⁶ Another difference between rats and mice responses was observed during the healing process. Adipocytes appeared at the implantation site instead of the mild fibrosis observed in mice.¹⁰ It is unlikely that this process corresponded to posttraumatic lipomas⁴⁷ since observed adipose tissue was histologically normal without spreading out of the initial implant area. In association to inflammatory reaction, several local growth factors or inflammatory mediators could trigger the differentiation of preadipocytes into mature adipocytes.⁴⁷⁻⁵² Moreover, the presence of adipocytes within a titanium mesh implant has been reported previously in rats.⁵ Therefore the healing process observed in the present

study is thought to be a consequence of combination of characteristics between the animal species and the implanted material.

In vivo, Contramid[®] cytocompatibility has also been observed in the present work. Degenerating PMNs were recorded during the acute phase of inflammatory reaction with Contramid[®]. Some necrotic muscle cells have been observed at the intramuscular Contramid[®] implantation site. However these events were transient and occurred only in the early stage of implantation. They are more likely attributed to the trauma elicited by the surgery than to Contramid[®] itself. Moreover muscle cells regenerated thereafter in contact with Contramid[®] indicating that Contramid[®] did not release locally toxic by-products.⁶ It has been demonstrated that starch-based polymer blends had no cytotoxicity *in vitro*.⁵³ Contramid[®] cytotoxicity could be further evaluated *in vitro* by measuring cell survival with the tetrazolium salt reduction assay³⁹ or *in vivo* by measuring the plasma creatine kinase concentration after intramuscular implantation.⁵⁴

2.2.7. Conclusion

From the results obtained in the present study, we can conclude that cross-linked high amylose starch is a biocompatible and bioabsorbable material. Further, this polysaccharide displayed an overall biocompatibility similar to other polymers. Contramid[®] resorption seems to be a combination of extracellular degradation and macrophage phagocytosis. Tissue response to Contramid[®] was similar regardless of implantation site and healing process was characterized by appearance of fat tissue. Thus Contramid[®] is a degradable material that might be used as a parenteral controlled delivery system. Further studies will be necessary to evaluate Contramid[®] biofunctionality.

2.2.8. Acknowledgements

We thank Mrs. Jacinthe Cardin, Line Pepin, Bibiane Pépin and Mr. Jules Deslandes for their precious technical support in histology and immunohistochemistry. We are also grateful to Mr. Luc Moquin for his valuable technical assistance in microscopy illustrations.

2.2.9. References

1. Chandra R, Rustgi R. Biodegradable polymers. *Prog Polym Sci* 1998;23:1273-1335.
2. Pulapura S, Kohn J. Trends in the development of bioresorbable polymers for medical applications. *J Biomater Appl* 1992;6:216-250.
3. Heller J, Barr J, Ng SY, Shen HR, Schwach-Abdellaoui K, Emmahl S, Rothen-Weinhold A, Gurny R. Poly(ortho esters): their development and some recent applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:121-128.
4. Langer R. New methods of drug delivery. *Science* 1990;249:1527-1533.
5. Jansen JA, Dhert WJA, van der Waerden JPCM, von Recum AF. Semi-quantitative and qualitative histologic analysis method for the evaluation of implant biocompatibility. *J Invest Surg* 1994;7:123-134.
6. Woodward SC. Evaluation by light microscopy. In: Von Recum AF, editor. *Handbook of biomaterials evaluation: Scientific, technical, and clinical testing of implant materials*. Philadelphia: Taylor & Francis, 1999. p. 599-612.
7. Anderson JM. *In vivo* biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials. *Eur J Pharm Biopharm* 1994;40:1-8.
8. Lenaerts V, Dumoulin Y, Mateescu MA. Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *J Control Release* 1991;15:39-46.
9. Lenaerts V, Moussa I, Dumoulin Y, Mebsout F, Chouinard F, Szabo P, Mateescu MA, Cartilier L, Marchessault R. Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. *J Control Release* 1998;53:225-234.

10. Désévaux C, Girard C, Lenaerts V, Dubreuil P. Characterization of subcutaneous Contramid[®]: host response and delivery of a potent analog of growth hormone-releasing factor. *Int J Pharm* 2002;232:119-129.
11. Björk E, Bjurström S, Edman P. Morphologic examination of rabbit nasal mucosa after nasal administration of degradable starch microspheres. *Int J Pharm* 1991;75:73-80.
12. Dakhil S, Ensminger W, Cho K, Niederhuber J, Doan K, Wheeler R. Improved regional selectivity of hepatic arterial BCNU with degradable microspheres. *Cancer* 1982;50:631-635.
13. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, Guide to the Care and Use of Experimental Animals, Vol. 1. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993.
14. Luna LG. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Downers Grove: Johnson Printers; 1992.
15. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory methods in histotechnology. Washington, D.C.: American Registry of Pathology; 1994.
16. Sewell WR, Wiland J, Craver BN. A new method of comparing sutures of ovine catgut with sutures of bovine catgut in three species. *Surg Gynecol Obstet* 1955;483-494.
17. Gomel V, McComb P, Boer-Meisel M. Histologic reactions to polyglactin-910, polyethylene and nylon microsuture. *J Reprod Med* 1980;25:56-59.
18. Ibim SM, Uhrich KE, Bronson R, El-Amin SF, Langer RS, Laurencin CT. Poly(anhydride-co-imides): *in vivo* biocompatibility in a rat model. *Biomaterials* 1998;19:941-951.
19. Nakamura T, Hitomi S, Watanabe S, Shimizu Y, Jamshidi K, Hyon SH, Ikada Y. Bioabsorption of polylactides with different molecular properties. *J Biomed Mater Res* 1989;23:1115-1130.
20. Leach KJ, Takahashi S, Mathiowitz E. Degradation of double-walled polymer microspheres of PLLA and P(CPP:SA)20:80. II. *In vivo* degradation. *Biomaterials* 1998;19:1981-1988.

21. Giardino R, Rocca M, Fini M, Buscaroli S, Giavaresi G, Aldini NN, Bacchini P, Bertoni F. Valutazioni sperimentali *in vitro* ed *in vivo* del rischio di infezione legato all'uso dei piu comuni fili di sutura. *Minerva Chir* 1992;47:1799-1805.
22. Anderson JM. Inflammation and the foreign body response. *Prob Gen Surg* 1994;11:147-160.
23. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation and repair. In: Cotran et al., editors. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. p. 51-92.
24. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliver Rev* 1997;28:5-24.
25. Bernatchez SF, Merkli A, Tabatabay C, Gurny R, Zhao QH, Anderson JM, Heller J. Biotolerance of a semisolid hydrophobic biodegradable poly(ortho ester) for controlled drug delivery. *J Biomed Mater Res* 1993;27:677-681.
26. Beumer GJ, van Blitterswijk CA, Ponec M. Degradative behaviour of polymeric matrices in (sub)dermal and muscle tissue of the rat: a quantitative study. *Biomaterials* 1994;15 :551-559.
27. Holder Jr WD, Gruber HE, Moore AL, Culberson CR, Anderson W, Burg KJL, Mooney DJ. Cellular ingrowth and thickness changes in poly-L-lactide and polyglycolide matrices implanted subcutaneously in the rat. *J Biomed Mater Res* 1998;41:412-421.
28. Hooper KA, Macon ND, Kohn J. Comparative histological evaluation of new tyrosine-derived polymers and poly(L-lactic acid) as a function of polymer degradation. *J Biomed Mater Res* 1998;41:443-454.
29. Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai HL, Leite SM, Tamada JA, Uyama S, Vacanti JP, Langer R, Mikos AG. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials* 2000;21:1837-1845.
30. Moussa IS, Lenaerts V, Cartilier LH. Effect of some physical parameters on the swelling properties of cross-linked amylose matrices. *Int J Pharm* 1998;173:35-41.

31. Rahmouni M, Lenaerts V, Massuelle D, Doelker E, Leroux JC. Influence of physical parameters and lubricants on the compaction properties of granulated and non-granulated cross-linked high amylose starch. *Chem Pharm Bull* 2002;50:1155-1162.
32. Ravenelle F, Marchessault RH, Légaré A, Buschmann MD. Mechanical properties and structure of swollen cross-linked high amylose starch tablets. *Carb Polymers* 2002;47:259-266.
33. Mohanty M, Hunt JA, Doherty PJ, Annis D, Williams DF. Evaluation of soft tissue response to a poly(urethane urea). *Biomaterials* 1992;13:651-656.
34. Ratner BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *J Control Release* 2002;78:211-218.
35. Salzmann DL, Kleinert LB, Berman SS, Williams SK. The effects of porosity on endothelialization of ePTFE implanted in subcutaneous and adipose tissue. *J Biomed Mater Res* 1997;34:463-476.
36. Sharkawy AA, Klitzman B, Truskey GA, Reichert WM. Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. II. Plasma-tissue exchange properties. *J Biomed Mater Res* 1998;40:586-597.
37. Märtson M, Viljanto J, Hurme T, Laippala P, Saukko P. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An *in vivo* subcutaneous study in the rat. *Biomaterials* 1999;20:1989-1995.
38. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* 1997;34:21-28.
39. Draye JP, Delaey B, Van de Voorde N, Van Den Bulcke A, De Reu B, Schacht E. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. *Biomaterials* 1988;19:1677-1687.
40. Forsberg JO. Transient blood flow reduction induced by intra-arterial injection of degradable starch microspheres. *Acta Chir Scand* 1978;144:275-281.

41. Artursson P, Arro E, Edman P, Ericsson JLE, Sjöholm I. Biodegradable microspheres V: stimulation of macrophages with microparticles made of various polysaccharides. *J Pharm Sci* 1987;76:127-133.
42. Artursson P, Johansson D, Sjöholm I. Receptor-mediated uptake of starch and mannan microparticles by macrophages: relative contribution of receptors for complement, immunoglobulins and carbohydrates. *Biomaterials* 1988;9:241-246.
43. Artursson P, Berge A, Edman P. Biochemical and cellular effects of degraded starch microspheres on macrophages. *Int J Pharm* 1989;52:183-190.
44. Artursson P, Edman P, Sjöholm I. Biodegradable microspheres I: duration of action of dextranase entrapped in polyacryl starch microparticles *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;231:705-712.
45. Laakso T, Artursson P, Sjöholm I. Biodegradable microspheres IV: factors affecting the distribution and degradation of polyacryl starch microparticles. *J Pharm Sci* 1986;75:962-967.
46. Rahmouni M, Chouinard F, Nekka F, Lenaerts V, Leroux JC. Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on *in vitro* release of sodium diclofenac. *Eur J Pharm Biopharm* 2001;51:191-198.
47. Signorini M, Campiglio GL. Posttraumatic lipomas : where do they really come from? *Plast Reconstr Surg* 1998;101:699-705.
48. Ailhaud G. Adipose cell differentiation in culture. *Mol Cell Biochem* 1982;49:17-31.
49. Ailhaud G. Hormones et développement adipocytaire. *Ann Endocrinol* 1997;58:129-131.
50. Butterwith SC. Regulators of adipocyte precursor cells. *Poultry Sci* 1997;76:118-123.
51. Levine JA, Jensen MD, Eberhardt NL, O'Brien T. Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth. *J Clin Invest* 1998;101:1557-1564.

52. Shillabeer G, Kumar V, Tibbo E, Lau DCW. Arachidonic acid metabolites of the lipooxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation. *Metabolism* 1998;47:461-466.
53. Mendes SC, Reis RL, Bovell YP, Cunha AM, Van Blitterswijk CA, De Bruijn JD. Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery: a preliminary study. *Biomaterials* 2001;22:2057-2064.
54. Kranz H, Brazeau GA, Napaporn J, Martin RL, Millard W, Bodmeier R. Myotoxicity studies of injectable biodegradable in-situ forming drug delivery systems. *Int J Pharm* 2001;212:11-18.

2.3. Article 3 : Characterization of cross-linked high amylose starch matrix implants 1. *In vitro* release of ciprofloxacin

Cyril Désévaux^{a,b,*}, Pascal Dubreuil^c, Vincent Lenaerts^b

^a Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal (QC), H3C 3J7, Canada

^b Labopharm inc., 1208 Bergar, Laval (QC), H7L 5A2, Canada

^c Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, (QC), J2S 7C6, Canada

* Corresponding author: Cyril Désévaux, Labopharm inc., 1208 Bergar, Laval, Qc, H7L 5A2, Canada. Tel.: + 450-629-7776; fax: + 450-663-1555. *E-mail address:* cyril.desevaux@umontreal.ca

Reprinted from *Journal of Controlled Release* 82 : 83-93, © Copyright (2002), with permission from Elsevier Science.

2.3.1. Abstract

The objective of this study was to characterize *in vitro* the potential of cross-linked high amylose starch (CLHAS) as an implant matrix for the delivery of ciprofloxacin (CFX). Direct compression of dry blends of four different matrices: control CLHAS; CLHAS with 1 % hydrogenated vegetable oil (HVO); and CLHAS with 10 or 20 % hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), each of them with three CFX loadings (2.5, 5.0 and 7.5 %) was performed to prepare twelve implant formulations. All CLHAS implants were used for 24-hour dissolution tests to evaluate swelling, erosion, water uptake and CFX

release. Additionally, 1%-HVO CLHAS implants were used for an extended dissolution test. The presence of HPMC in the matrix increased CFX release rate, swelling, erosion and water uptake in a concentration-dependent manner whereas HVO had no effect. With increasing drug loading, a decrease of cumulative CFX percent release was observed in both 24-hour and extended dissolution tests. Of the different formulations tested, CLHAS implants with 1 % HVO and 7.5 % CFX provided the longest period of drug delivery without any initial burst effect.

2.3.2. Keywords

CLHAS implants; Ciprofloxacin release; Swelling; Erosion; Water uptake

2.3.3. Introduction

Cross-linked high amylose starch (CLHAS) was firstly developed for the preparation of controlled release solid oral dosage forms [1]. Obtained by direct compression, CLHAS matrix tablets can be characterized by a quasi zero order drug release over 12 to 24 hours [1,2]. Moreover, an excellent biocompatibility of CLHAS upon subcutaneous and intramuscular implantation has been demonstrated [3,4]. Ciprofloxacin (CFX) is a leader among the third generation fluoroquinolones with a broad spectrum of antibacterial activity and a good penetration in most tissues [5-7]. Quinolones have the advantage of penetrating bone at sufficient concentrations to inhibit most members of the family of Enterobacteriaceae, and a large percentage of *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. strains [8]. Fluoroquinolones such as CFX are considered to be an appropriate choice for the prevention and treatment of infections in bone and soft tissues [8,9]. A local delivery system containing CFX is of great interest for this purpose and several previous studies have been carried out to characterize CFX delivery from different carriers [10-16]. The use of CLHAS for this application would be advantageous because

of its biocompatibility, biodegradability and cost effectiveness, which is particularly critical IN veterinary medicine.

The objectives of the present study were first to study and compare *in vitro* swelling, erosion, water uptake and CFX release from different CLHAS matrix formulations over 24 hours and, second to determine the most appropriate formulation with a minimal burst effect and a steady release of CFX over several days.

2.3.4. Materials and methods

2.3.4.1. Materials

Ciprofloxacin HCl was kindly supplied by Betachem Inc. (Upper Saddle River, NJ, USA) and CLHAS (Contramid[®]) was provided by Labopharm Inc. (Laval, QC, Canada). Hydroxypropylmethylcellulose K100M (HPMC) was purchased from The Dow Chemical Company (Midland, MI, USA), magnesium stearate from Street Chemicals & Co (Montreal, QC, Canada) and hydrogenated vegetable oil (HVO) - Lubritab[®] - from Penwest Pharmaceuticals Co (Patterson, NY, USA).

2.3.4.2. Preparation of implants

Three CFX loading levels (2.5, 5.0 and 7.5 % w/w) were incorporated in dry blends of four excipient combinations: 1) CLHAS (control); 2) CLHAS with 1 % HVO; 3) CLHAS with 0.5 % magnesium stearate and 10 % HPMC; and 4) CLHAS with 0.5 % magnesium stearate and 20 % HPMC. All excipient blends, each of them loaded with 2.5, 5.0 and 7.5 % CFX, were compressed with a 7.1 mm-diameter round punch on a single station tablet press (F4, Stokes, PA, USA) providing 4.8-mm thick 200 mg implants which were used for 24-hour dissolution test. Additionally, 1%-HVO CLHAS implants were used for an extended dissolution test.

2.3.4.3. Twenty-four hour dissolution tests

2.3.4.3.1. Evaluation of ciprofloxacin release

Twelve formulations were tested in triplicate over 24 hours using a U.S.P. type III dissolution apparatus (Bio-Dis extended release tester, Vankel Industries Inc, NJ, USA) at 10 dips per minute in isotonic phosphate buffered saline (PBS pH 7.4) at 37°C. Ciprofloxacin HCl was assayed spectrophotometrically (HP8453 UV-Visible spectrophotometer, Hewlett-Packard GmbH, Germany) at 277 nm [15]. Concentrations of CFX were obtained from a standard curve.

2.3.4.3.2. Evaluation of implant swelling

It has previously been reported with CLHAS tablets that axial swelling occurred faster and was more pronounced at equilibrium than radial swelling [17]. Therefore, for a comparative study of implant swelling with various compositions, only axial swelling was considered. Implant thickness was measured before and after dissolution testing and the pre/post dissolution thickness swelling ratio was expressed as a percentage of the original thickness.

2.3.4.3.3. Evaluation of implant erosion

A gravimetric method was used to record erosion of implants after a 24-hour dissolution test. Each implant was weighed before dissolution test (W_0). This mass was corrected (W_{d0}) for loss on drying measured by desiccation of the respective powder blends. Moisture was similar in various blends before (powder) and after (crushed tablets) compression. Immediately after dissolution testing, implants were extracted from PBS, briefly patted with lint-free cleaning tissues to remove the excess solution on its surface and weighed (W_{w24}). Implants were weighed again after an additional 24-hour air drying at

105°C (W_{d24}). Weight of CFX released after 24 hours (W_{CFX24}) was calculated from UV spectrophotometry assays. Implant erosion was then obtained using the following equation:

$$\% Erosion = \frac{(W_{d0} - W_{CFX24}) - W_{d24}}{W_{d0}} 100 \quad (1)$$

2.3.4.3.4. Evaluation of implant water uptake

Water uptake of implants after a 24-hour dissolution test was calculated using the following equation:

$$\% WaterUptake = \frac{W_{w24} \left(\frac{100}{100 - Erosion} \right) - (W_0 - W_{CFX24})}{W_0} 100 \quad (2)$$

2.3.4.4. Extended *in vitro* drug release experiment

Experiment was carried out over 21 days with 1%-HVO CLHAS implants loaded with 2.5, 5.0 and 7.5% CFX (n = 5). Implants were individually immersed in 20 mL of PBS. Watertight vessels were maintained at 37° C in a shaking bath. Implants were transferred into 20 mL of fresh PBS every 24 hours. Ciprofloxacin HCl was assayed spectrophotometrically at 277 nm in daily samples of the dissolution medium [15]. Concentrations of CFX were obtained from a standard curve.

2.3.4.5. Statistical analysis

Similarity factor f_2 tests [18] were used to compare CFX delivery profiles between matrices of a similar loading (24-h dissolution test) and between loadings of a similar matrix (24-h and extended dissolution tests). Implant swelling, erosion and water uptake data were subjected to ANOVA tests with CFX loading (2.5, 5.0 and 7.5 %) and matrix formulation (Control, 1%-HVO, 10 and 20%-HPMC) as main factors. Possible two-way interactions were also evaluated. Tukey's *post-hoc* tests with statistical significance set at

$P \leq 0.05$ were used to examine differences between pairs of loadings and between pairs of formulations.

2.3.5. Results

2.3.5.1. Twenty-four hour dissolution tests

2.3.5.1.1. Evaluation of ciprofloxacin release

An excellent reproducibility was observed on cumulative CFX release profiles with the twelve formulations (Fig. 1a, 1b and 1c). Overall, antibiotic recovery after 24 h ranged from $31.7 \% \pm 0.4$ (Fig. 1c) to $51.7 \% \pm 0.6$ (Fig. 1a) with the control CLHAS implants loaded with 7.5 % CFX and the 20%-HPMC CLHAS implants loaded with 2.5 % CFX, respectively. These results indicate that CFX release was extended over several days with CLHAS implants even when additional excipients were used.

The effect of matrix composition on release profile was studied for the different loadings tested (Table 1a). Values of f_2 increased with an increasing similarity between two CFX release curves. According to the FDA guidelines [19], two delivery profiles are considered different when f_2 is below 50. For each loading, the CFX release curve of control implants was used as the reference. Delivery profiles of 1%-HVO CLHAS implants had very high f_2 values (89.7 - 99.9) and were consequently considered similar to control profiles. With increasing concentration of HPMC in the matrix, f_2 values decreased indicating an increasing difference (not significant) from control. Ciprofloxacin delivery over 24 hours was always slower for control and 1%-HVO CLHAS implants than for those containing HPMC. The presence of HPMC in the matrix increased CFX release rate in a concentration-dependent manner.

The effect of drug loading on CFX delivery profile was studied for each matrix tested (Table 1b). Implants loaded with 7.5 % CFX were different ($f_2 < 50$) from those

loaded with 2.5% CFX in all cases except with 20%-HPMC matrix ($f_2 = 52$). Other comparisons (5.0 vs 2.5%-CFX implants and 7.5 vs 5.0%-CFX implants) gave f_2 values superior to 50, which does not allow a conclusion of a significant difference [19]. However values of $f_2(7.5\% \text{ vs } 2.5\%)$ were always inferior to those of $f_2(5.0\% \text{ vs } 2.5\%)$ (Table 1b) indicating that CFX percent release rate decreased with increasing drug loading in a dependent manner, regardless of implant excipient composition.

Table 1a : f_2 values as a function of matrix in 24-hour dissolution tests with control CLHAS implants as the reference.

Drug loading	f_2 values		
	1%-HVO	10%-HPMC	20%-HPMC
2.5%-CFX	89.7	72.6	69.7
5.0%-CFX	99.8	65.0	57.5
7.5%-CFX	99.9	74.1	64.5

Table 1b : f_2 values as a function of CFX loading matrix in 24-hour dissolution tests.

Matrix composition	CFX loading comparison		
	$f_2(5.0\% \text{ vs } 2.5\%)$	$f_2(7.5\% \text{ vs } 2.5\%)$	$f_2(7.5\% \text{ vs } 5.0\%)$
Control	69.6	48.8	67.0
1%-HVO	56.3	46.3	67.3
10%-HPMC	67.1	48.5	60.0
20%-HPMC	77.5	52.0	59.3

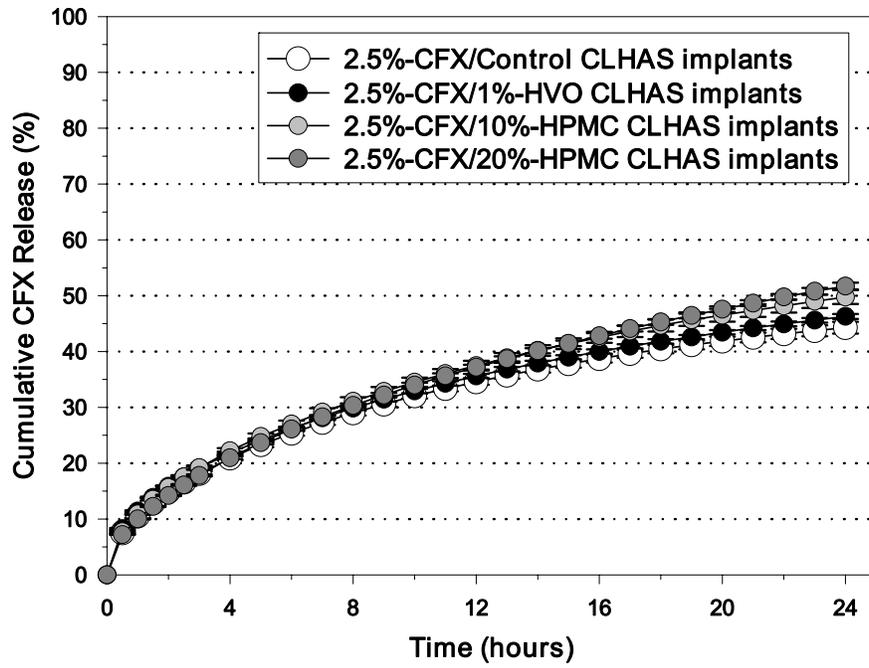


Fig.1a

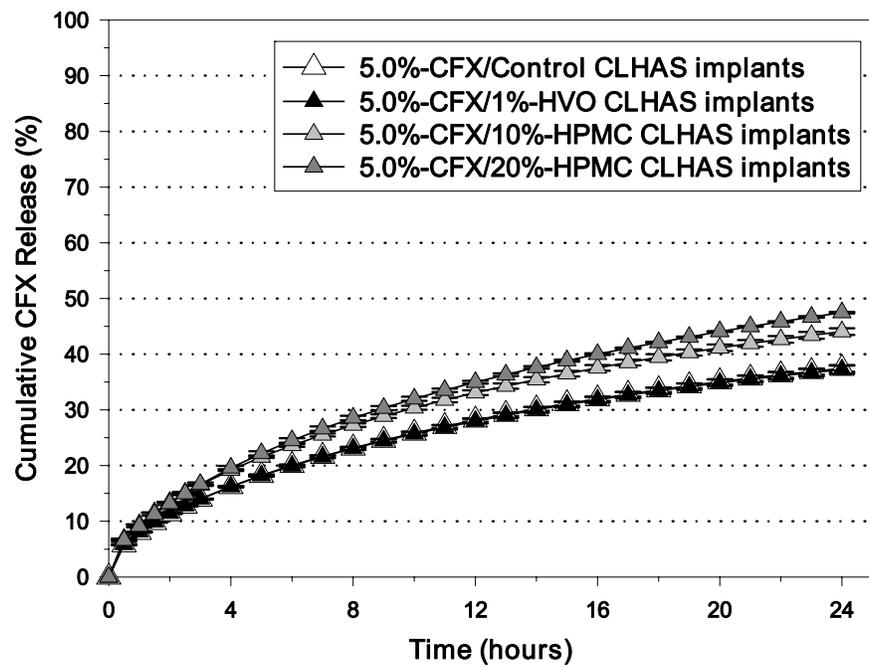


Fig.1b

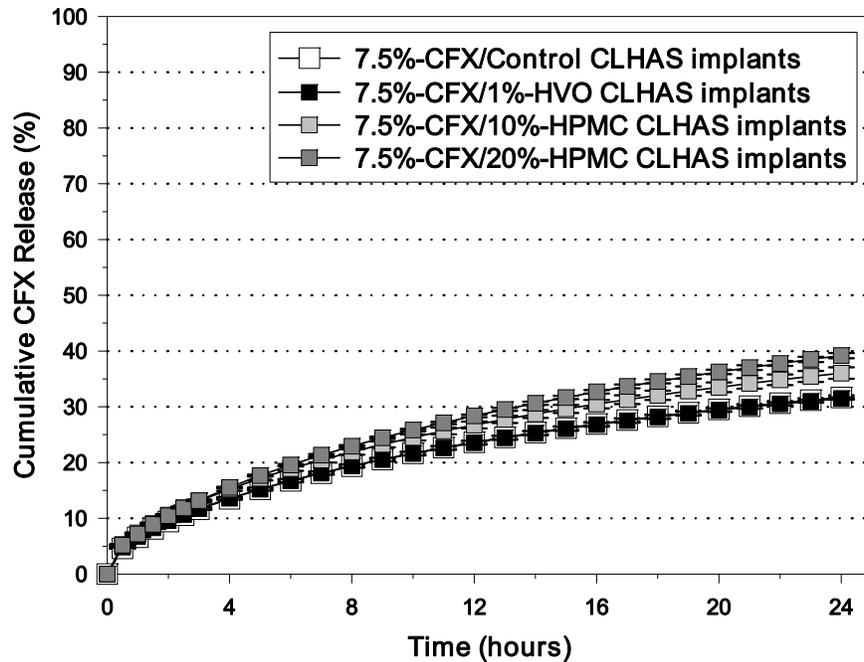


Fig. 1c

Figure 1 : 24-hour cumulative release of CFX (mean \pm S.D., n = 3) from CLHAS implants containing a) 2.5%, b) 5.0% and c) 7.5% CFX with different excipients (S.D. < 1.2 % is hidden by plots).

2.3.5.1.2. Evaluation of implant swelling

A significant matrix:loading interaction ($P < 0.01$) was observed indicating that the matrix composition produced a different swelling in relation to the loading.

For all CFX loadings (Table 2a): 1) thickness swelling was minimal with control and 1%-HVO implants and was not different ($P > 0.05$) between these two matrices; 2) swelling was significantly increased ($P < 0.01$) in CLHAS implants containing both 10 and 20 % of HPMC compared to control and HVO implants; 3) swelling was significantly higher ($P < 0.01$) in 20%-HMPMC implants than in 10%-HPMC implants.

For the 10%-HPMC matrix, swelling was significantly higher ($P < 0.01$) with 2.5%-CFX loading than with 5.0 and 7.5%-CFX loadings. For the 20%-HPMC matrix, swelling was significantly different ($P < 0.01$) between 5.0%-CFX loading and other loadings. Drug loading had an effect on swelling in HPMC containing matrices but not in other matrices. Addition of HVO did not modify significantly ($P > 0.05$) swelling as compared to control.

In summary, swelling was mainly affected by the presence of HPMC in a concentration-dependent manner. Swelling was minimal and constant in control and 1%-HVO CLHAS implants at all drug loadings tested.

Table 2a : Axial swelling (mean \pm S.D., $n = 3$) of 12 different formulations of CLHAS implants after a 24-hour dissolution test.

Drug loading	Axial swelling (%)			
	Control	1%-HVO	10%-HPMC	20%-HPMC
2.5%-CFX	48 ^{a,x} \pm 1.9	45 ^{a,x} \pm 0.9	71 ^{b,x} \pm 1.0	122 ^{c,x} \pm 3.3
5.0%-CFX	48 ^{a,x} \pm 3.0	47 ^{a,x} \pm 0.8	58 ^{b,y} \pm 2.2	93 ^{c,y} \pm 0.1
7.5%-CFX	48 ^{a,x} \pm 2.1	49 ^{a,x} \pm 0.5	56 ^{b,y} \pm 0.8	119 ^{c,x} \pm 4.4

^{a,b,c} Means with different superscripts in a same row are significantly different ($P \leq 0.05$)

^{x,y} Means with different superscripts in a same column are significantly different ($P \leq 0.05$)

2.3.5.1.3. Evaluation of implant erosion

A significant matrix:loading interaction ($P < 0.01$) was present showing that the matrix eroded differently in relation to the loading.

For all CFX loadings (Table 2b), the HPMC matrices showed a significantly higher ($P < 0.01$) degree of erosion than the control. Likewise, the 1%-HVO formulation had a significantly faster ($P < 0.01$) erosion than the control but only at 5.0 % drug loading.

Compared to the 1%-HVO matrix, both 10 and 20%-HPMC matrices were significantly more eroded ($P = 0.03$ and $P < 0.01$, respectively) at 2.5 % drug loading while only the matrix containing 20 % HPMC was different ($P = 0.05$) at 7.5 % drug loading. Between the two CLHAS matrices containing HPMC, erosion was significantly different ($P < 0.01$) at 2.5 % drug loading.

As observed for swelling, erosion was mainly affected by the presence of HPMC in a concentration-dependent manner. Erosion was minimal with control and 1%-HVO CLHAS implants.

Table 2b : Erosion (mean \pm S.D., n = 3) of 12 different formulations of CLHAS implants after a 24-hour dissolution test.

Drug loading	Erosion (%)			
	Control	1%-HVO	10%-HPMC	20%-HPMC
2.5%-CFX	2.1 ^{a,x} \pm 1.0	2.8 ^{a,x} \pm 0.3	4.6 ^{b,x} \pm 0.4	6.8 ^{c,x} \pm 0.9
5.0%-CFX	1.9 ^{a,x} \pm 0.7	4.6 ^{b,y} \pm 0.4	4.8 ^{b,x} \pm 0.7	6.0 ^{b,x} \pm 0.6
7.5%-CFX	1.1 ^{a,x} \pm 0.3	2.4 ^{a,b,x} \pm 0.2	3.2 ^{b,c,x} \pm 0.6	4.1 ^{c,y} \pm 0.3

^{a,b,c} Means with different superscripts in a same row are significantly different ($P \leq 0.05$)

^{x,y} Means with different superscripts in a same column are significantly different ($P \leq 0.05$)

2.3.5.1.4. Evaluation of implant water uptake

A significant matrix:loading interaction ($P < 0.01$) was observed indicating that matrix composition induced different water uptake in relation to the loading.

For all CFX loadings (Table 2c): 1) water uptake was minimal with control and 1%-HVO implants and was not different ($P > 0.05$) between these two matrices; 2) water uptake was significantly increased ($P < 0.01$) with CLHAS implants containing both 10 and

20 % of HPMC compared to control and 1%-HVO implants; 3) water uptake was significantly higher ($P < 0.01$) with 20%-HPMC implants than with 10%-HPMC implants.

For all matrices (Table 2c), water uptake was significantly higher ($P < 0.01$) with the 2.5 % CFX loading than with 5.0 and 7.5 % loadings. For the two HPMC formulations, water uptake decreased significantly ($P < 0.01$) with increasing loading.

In summary, water uptake was increased by the presence of HPMC in a concentration-dependent manner and was minimal in control and 1%-HVO CLHAS implants. Water uptake was affected by drug loading, particularly in matrices containing HPMC.

Table 2c : Water uptake (mean \pm S.D., n = 3) of 12 different formulations of CLHAS implants after a 24-hour dissolution test.

Drug loading	Water uptake (%)			
	Control	1%-HVO	10%-HPMC	20%-HPMC
2.5%-CFX	149 ^{a,x} \pm 1.0	147 ^{a,x} \pm 2.5	210 ^{b,x} \pm 1.6	288 ^{c,x} \pm 2.6
5.0%-CFX	134 ^{a,y} \pm 5.7	138 ^{a,y} \pm 0.3	181 ^{b,y} \pm 2.7	246 ^{c,y} \pm 1.1
7.5%-CFX	136 ^{a,y} \pm 1.3	138 ^{a,y} \pm 1.4	174 ^{b,z} \pm 0.1	205 ^{c,z} \pm 0.9

^{a,b,c} Means with different superscripts in a same row are significantly different ($P \leq 0.05$)

^{x,y,z} Means with different superscripts in a same column are significantly different ($P \leq 0.05$)

2.3.5.2. Extended drug release

Ciprofloxacin release was sustained over 21 days with a good reproducibility and a quasi-complete recovery of the drug i.e. 96.2 % (\pm 1.5), 90.8 % (\pm 3.0) and 86.6 % (\pm 2.5) for the 2.5, 5.0 and 7.5%-CFX implants, respectively (Fig. 2a).

As previously described with 24-h delivery profiles, the release curve of 2.5%-CFX implants was used as the reference in calculation of f_2 values for comparison with 5.0 and 7.5%-CFX release curves. Values of f_2 ranged between 54.3 and 59.5 with the delivery profile of 5.0%-CFX implants while f_2 was always below 50 (42.4 to 46.9) with the delivery profile of 7.5%-CFX implants. Cumulative CFX percent release at any given time point decreased with increasing drug loading. Delivery profiles of 2.5 and 7.5%-CFX implants were different. However f_2 values for comparison of release curves between 5.0 and 7.5%-CFX implants ranged between 60.9 and 65.8.

Cumulative CFX percent release was characterized by a two-part profile (Fig. 2a). A slightly higher release rate over the first five days was followed by a slower phase. Values of f_2 decreased over the first part of the curve and then slowly increased. The initial (0 to 48 h) CFX release rate decreased with increasing CFX loading (Fig. 2b). Beyond that point, CFX release rates were similar regardless of the loading.

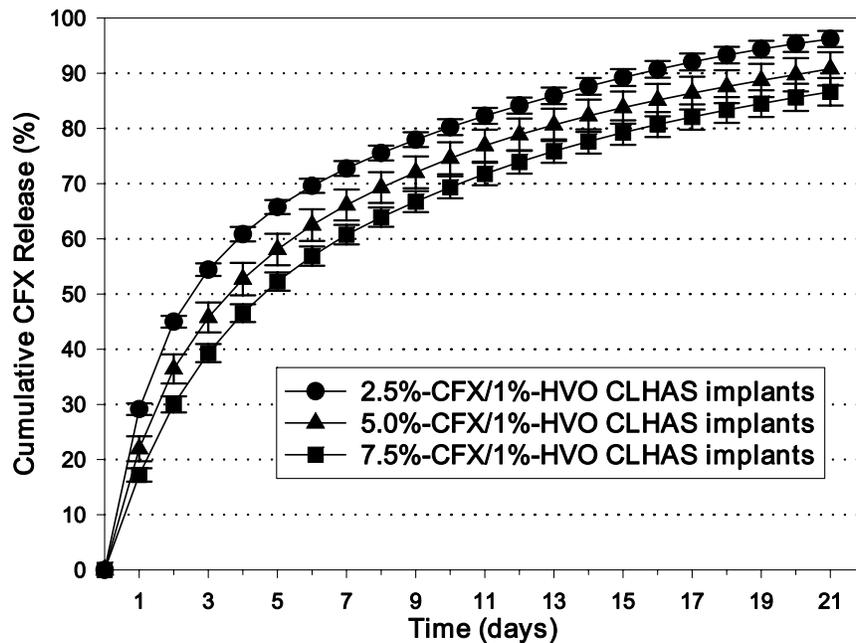


Fig. 2a

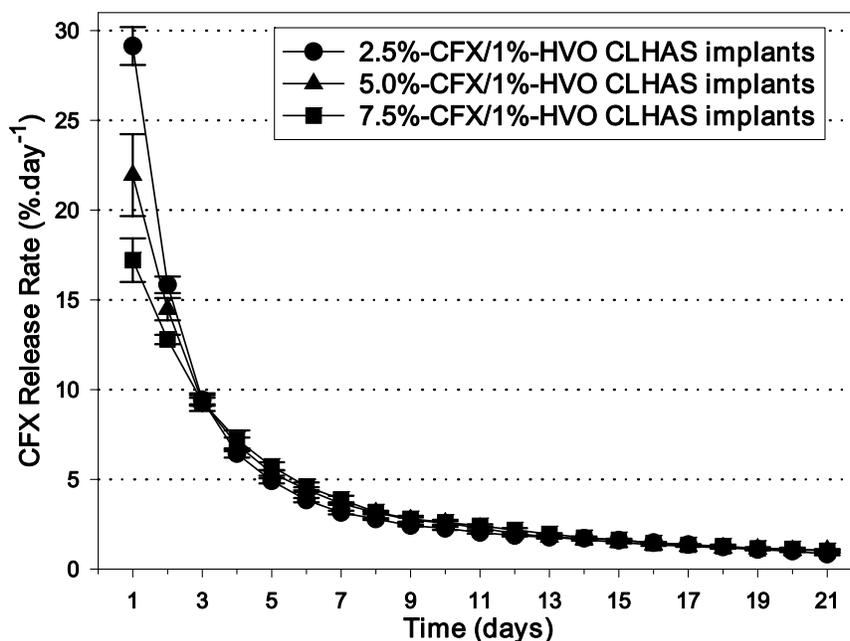


Fig. 2b

Figure 2 : Extended dissolution test with 1%-HVO CLHAS implants containing 2.5, 5.0 and 7.5% CFX (mean \pm S.D., n = 5): a) cumulative and b) daily percent release of CFX.

2.3.6. Discussion

2.3.6.1. Twenty-four hour dissolution tests

Twelve formulations were screened to select those characterized by a minimal burst effect and a slow release of CFX over 24 h. Usually used in controlled-release preparations, HPMC is a non-ionic water-soluble cellulose ether derivative widely used to sustain delivery of drugs [20-22]. In oral formulations, addition of HPMC to CLHAS matrices has been shown to prevent degradation by digestive α -amylase enzyme thus decreasing drug release rate [23]. This characteristic would have been interesting with implants. However with HPMC in the implant, swelling was exacerbated, erosion and water uptake were increased and CFX delivery was accelerated. The higher rate of implant erosion with

HPMC could also bias the measurement of swelling which should actually have a higher value. High uptake of a high ionic strength medium like isotonic PBS ($\mu = 0.2$) by HPMC K100M may change matrix properties by altering the thickness of the peripheral gel layer observed in swelling-controlled release systems [24-26] including CLHAS tablets [2,17]. This can also increase implant erosion and drug diffusion. An implant with increased erosion may be degraded more easily by host reaction and consequently be active over a shorter period of time affecting *in vivo* sustained release. An implant with a high degree of swelling may modify host response and the drug release kinetics by the increased pressure on surrounding tissues. Moreover, inflammatory cellular reactions may be modified such parameters as polymer hydrophilicity [27].

It has been previously reported that the gel layer formed on the surface of tablets was relatively thicker when a higher concentration of HPMC was used, achieving a more sustained release [21]. However in this study, implants with HPMC released CFX faster than controls in a HPMC concentration-dependent manner.

Implants of CLHAS are a promising drug delivery system for parenteral administration of CFX in view of their swelling, erosion, water uptake and CFX delivery rate. Properties of CLHAS were not altered by the addition of 1 % HVO which is a necessary lubricant for large-scale production. For this reason, 1%-HVO implants were selected for extended dissolution testing. Hydroxypropylmethylcellulose K100M was not used in the implants prepared subsequently.

2.3.6.2. Extended drug release

In vitro CFX release from CLHAS matrix was monitored over several days. First, relative percent CFX release decreased with increasing drug loading with a difference at day 21 of about 10 % between the 2.5 and the 7.5%-CFX implants (Fig. 2a). Consequently, after 21 days of delivery, approximately 2 mg of CFX was remaining in a 7.5%-CFX implant while a 2.5%-CFX implant was nearly exhausted. This characteristic is of interest

since increasing implant loading can prolong release duration, in line with the trend observed in the 24-hour dissolution tests. In the present case, the largest difference was observed during the first two days of the 21-day profile, while the subsequent release occurred at similar rates. Actually, the initial burst effect was lower with a higher CFX loading (Fig. 2b). This is a very interesting characteristic since it indicates that increasing drug loading should also not result in a higher burst effect *in vivo*. Therefore CLHAS implants with a higher loading (7.5 %) should be more advantageous *in vivo* and are thus the most appropriate formulation for possible local antibacterial therapy.

It has been reported that, by increasing drug loading in ethylcellulose matrices, drug release mechanism could change [28]. Although the mode of action of CLHAS is different to ethylcellulose, one cannot exclude that a similar phenomenon may explain the differences of release rate between the three loading levels in the present study.

Another factor to consider is the potential interaction between polymer and drug which could affect drug diffusion through the matrix due to attracting or repelling forces. Recently, it has been demonstrated that release of acetylsalicylic acid was slower from carboxylated cross-linked high amylose starch when the drug loading increased [29]. This was attributed to physical interactions between carboxylic groups of the drug and the polymer. In the present study, it is possible that an interaction between CFX HCl and CLHAS occurred.

Additionally, drug solubility and hydrophilicity must be considered because at a high loading, water diffusion into the matrix might be altered. In this study, water uptake decreased inversely to drug loading regardless of matrix composition indicating an influence of the hydrophobic character of CFX.

Provided *in vivo* release conditions correlate with the *in vitro* delivery profile, CLHAS implants may be superior to poly(lactic acid) (PLA) [11,13] and poly(lactides-co-glycolides) (PLGA) [15] polymers. Firstly, very low concentrations of CFX were obtained

in vitro for the first ten days with PLA [11,13] at time when high local antibiotic tissue concentrations are necessary to control bacterial population during the first steps of colonization. Conversely, CLHAS provided an initial release that should be effective in preventing bacterial colonization locally while not high enough to have systemic side effects. Secondly, CFX delivery profiles from PLGA showed two phases separated by a period of time where release rate was sufficiently low to allow resistant bacteria to develop [15]. In contrast, CFX was continuously released from CLHAS implants. These differences probably result from a swelling and/or diffusion controlled mechanism with CLHAS previously described [1,2] versus a bulk polymer erosion controlled mechanism with PLA and PLGA. Indeed, the peripheral formation of a gel layer described in swelling-controlled release systems [24-26] has also been observed with CLHAS tablets [2,17,30]. Gel layer thickness is considered as a major factor for controlled delivery of drugs in such swellable hydrophilic matrices. It is physically delimited by an erosion front at the interface with the medium, a swelling front with the glassy core and a third intermediate dissolution front [24,31]. Classically, during drug delivery, the gel layer thickness first increases due to polymer swelling, then remains fairly constant and finally decreases by erosion [24,26]. However, the gel layer with CLHAS is formed early *in vitro* [32] and remains roughly constant over time with a minimal erosion [2]. Indeed, after 24-hour and 21-day dissolution tests, CLHAS implants looked similar macroscopically and cross-sectioned implants after 21 days still had a peripheral gel layer. The near immediate formation of a gel is believed to be a key parameter in controlling the initial burst. The permanent gel layer thickness is probably involved in the subsequent concentration-independent drug release.

Completion of an *in vivo* pharmacokinetic study of CLHAS implants with high CFX loadings is now necessary to correlate with these *in vitro* results.

2.3.7. Conclusions

Cross-linked high amylose starch implants are characterized by minimal swelling, erosion and water uptake. Increasing CFX loading in CLHAS implants resulted in a prolonged release and a well-controlled initial burst effect. Moreover, CFX delivery profiles over several days would be more satisfying for local antimicrobial therapy without HPMC in implants. Of the different formulations tested, CLHAS implants with 1 % HVO and 7.5 % CFX would be the most appropriate for *in vivo* testing in local prevention and treatment of tissue infections. The development of CLHAS implants has been continued by an *in vivo* pharmacokinetic study [33].

2.3.8. Acknowledgements

We are very grateful to Sonia Gervais and Scilla Corneli for their valuable contribution in implant manufacturing. We wish also to thank Guy Beauchamp for his assistance in statistical tests on data.

2.3.9. References

- [1] V. Lenaerts, Y. Dumoulin, M.A. Mateescu, Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets, *J. Control. Release* 15 (1991) 39-46.
- [2] V. Lenaerts, I. Moussa, Y. Dumoulin, F. Mebsout, F. Chouinard, P. Szabo, M.A. Mateescu, L. Cartilier, R. Marchessault, Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances, *J. Control. Release* 53 (1998) 225-234.
- [3] C. Désévaux, C. Girard, V. Lenaerts, P. Dubreuil, Characterization of subcutaneous Contramid[®] implantation: host response and delivery of a potent analog of the growth hormone-releasing factor, *Int. J. Pharm.* 232 (2002) 119-129.

- [4] C. Désévaux, P. Dubreuil, V. Lenaerts, C. Girard, Evaluation of tissue reaction and biodegradation of implanted cross-linked high amylose starch in rats, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* (2002) In press.
- [5] L.R. Gill, K.J. Mayberry-Carson, B. Tober-Meyer, F. Hodin, D.W. Lambe, B.G. Painter, Ciprofloxacin concentrations in serum, bone and bone marrow of rabbits, *Microbios* 58 (1989) 113-126.
- [6] A. Sanchez-Navarro, A.C. Casquero-Dorado, M. Weiss, Distribution and binding kinetics of ciprofloxacin and ofloxacin in the hindlimb of the rat, *Pharm. Res.* 16 (1999) 587-591.
- [7] R. Wise, Future management of serious infections with quinolones, *Clin. Drug. Invest.* 15 (1998) 39-46.
- [8] D.P. Lew, F.A. Waldvogel, Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis, *Drugs* 58 (1999) 85-91.
- [9] J.T. Mader, J.S. Cantrell, J. Calhoun, Oral ciprofloxacin compared with standard parenteral antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults, *J. Bone Joint Surg.* 72 (1990) 104-110.
- [10] A. Akashi, Y. Matsuya, M. Unemori, A. Akamine, Release profile of antimicrobial agents from α -tricalcium phosphate cement, *Biomaterials* 22 (2001) 2713-2717.
- [11] A.G. Andreopoulos, T. Korakis, E. Dounis, A. Anastasiadis, P. Tzivelekis, K. Kanellakopoulou, *In vitro* release of new quinolones from biodegradable systems: a comparative study, *J. Biomat. Appl.* 10 (1996) 338-347.
- [12] F.R. DiMaio, J.J. O'Halloran, J.M. Quale, *In vitro* elution of ciprofloxacin from polymethylmethacrylate cement beads, *J. Orthop. Res.* 12 (1994) 79-82.
- [13] K. Kanellakopoulou, M. Kolia, A. Anastasiadis, T. Korakis, E.J. Giamarellos-Bourboulis, A. Andreopoulos, E. Dounis, H. Giamarellou, Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluoroquinolones: an *in vitro* study, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 714-716.

- [14] C. Teupe, R. Meffert, S. Winckler, W. Ritzerfeld, P. Törmälä, E. Brug, Ciprofloxacin-impregnated poly-L-lactic acid drug carrier, *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 112 (1992) 33-35.
- [15] M. Ramchandani, D. Robinson, In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants, *J. Control. Release* 54 (1998) 167-175.
- [16] J.M. Schierholz, H. Steinhauser, A.F.E. Rump, R. Berkels, G. Pulverer, Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: morphological and structural features, *Biomaterials* 18 (1997) 839-844.
- [17] I. Moussa, L.H. Cartilier, Characterization of moving fronts in cross-linked amylose matrices by image analysis, *J. Control. Release* 42 (1996) 47-55.
- [18] J.W. Moore, H.H. Flanner, Mathematical comparison of curves with an emphasis on *in vitro* dissolution profiles, *Pharm. Tech.* 20 (1996) 64-74.
- [19] FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Modified Release Solid Oral Dosage Forms; Scale-up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, *In Vitro* Dissolution Testing, and *In Vivo* Bioequivalence Documentation, September 1997.
- [20] J.L. Ford, M.H. Rubinstein, J.E. Hogan, Propranolol hydrochloride and aminophylline release from matrix tablets containing hydroxypropylmethylcellulose, *Int. J. Pharm.* 24 (1985) 339-350.
- [21] T. Ishikawa, Y. Watanabe, K. Takayama, H. Endo, M. Matsumoto, Effect of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) on the release profiles and bioavailability of poorly water-soluble drug from tablets prepared using macrogol and HPMC, *Int. J. Pharm.* 202 (2000) 173-178.
- [22] T.D. Reynolds, S.H. Gerhke, A.S. Hussain, L.S. Shenouda, Polymer erosion and drug release characterization of hydroxypropyl methylcellulose matrices, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1115-1123.

- [23] F. Chouinard, V. Lenaerts, Protective effect of HPMC on cross-linked amylose controlled release tablets, *Proceed. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 24 (1997) 265-266.
- [24] P. Colombo, R. Bettini, G. Massimo, P.L. Catellani, P. Santi, N. Peppas, Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 991-997.
- [25] R.T.C. Ju, P.R. Nixon, M.V. Patel, Drug release from hydrophilic matrices. 1. New scaling laws for predicting polymer and drug release based on the polymer disentanglement concentration and the diffusion layer, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 1455-1463.
- [26] L. Yang, B. Johnson, R. Fassihi, Determination of continuous changes in the gel layer thickness of poly(ethylene oxide) and HPMC tablets undergoing hydration: a texture analysis study, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1902-1906.
- [27] J.A. Hunt, G. Meijjs, D.F. Williams, Hydrophilicity of polymers and soft tissue responses: a quantitative analysis, *J. Biomed. Mater. Res.* 36 (1997) 542-549.
- [28] S.H. Neau, M.A. Howard, J.S. Claudius, D.R. Howard, The effect of the aqueous solubility of xanthine derivatives on the release mechanism from ethylcellulose matrix tablets, *Int. J. Pharm.* 179 (1999) 97-105.
- [29] J. Mulhbacher, P. Ispas-Szabo, V. Lenaerts, M.A. Mateescu, Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings, *J. Control. Release* 76 (2001) 51-58.
- [30] P. Le Bail, F.G. Morin, R.H. Marchessault, Characterization of a crosslinked high amylose starch excipient, *Int. J. Biol.Macromol.* 26 (1999) 193-200.
- [31] C. Ferrero, A. Munoz-Ruiz, M.R. Jiménez-Castellanos, Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation, *Int. J. Pharm.* 202 (2000) 21-28.

- [32] I.S. Moussa, V. Lenaerts, L.H. Cartilier, Image analysis studies of water transport and dimensional changes occurring in the early stages of hydration in cross-linked amylose matrices, *J. Control. Release* 52 (1998) 63-70.
- [33] C. Désévaux, V. Lenaerts, C. Girard, P. Dubreuil, Characterization of Contramid[®] matrix implants. 2. *In vivo* release of ciprofloxacin, *J. Control. Release* 82 (2002) 95-103.

2.4. Article 4 : Characterization of cross-linked high amylose starch matrix implants 2. *In vivo* release of ciprofloxacin

Cyril Désévaux^{a,b,*}, Vincent Lenaerts^b, Christiane Girard^c, Pascal Dubreuil^c

^a Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal (QC), H3C 3J7, Canada

^b Labopharm inc., 1208 Bergar, Laval (QC), H7L 5A2, Canada

^c Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, (QC), J2S 7C6, Canada

* Corresponding author: Cyril Désévaux, Labopharm inc., 1208 Bergar, Laval, Qc, H7L 5A2, Canada. Tel.: + 450-629-7776; fax: + 450-663-1555. E-mail address: cyril.desevaux@umontreal.ca

Reprinted from *Journal of Controlled Release* 82 : 95-103, © Copyright (2002), with permission from Elsevier Science.

2.4.1. Abstract

The purpose of this study was to develop a cross-linked high amylose starch (CLHAS) matrix implant as a sustained antimicrobial delivery system for local prevention and/or treatment of osteomyelitis. Implants (200 mg) of CLHAS containing 2.5 % (5 mg), 7.5 % (15 mg), 15.0 % (30 mg) and 20.0 % (40 mg) of ciprofloxacin (CFX), were prepared by direct compression of dry blends. Rabbits were administered six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants along the femur between the quadriceps and *biceps femoris* muscles to determine systemic (serum) versus local (muscle and bone) CFX concentrations

over one month. Blood samples were taken throughout the study for CFX assay. Muscle and femur were collected at 3, 7, 14, 21 and 28 days after implantation for host response evaluation and CFX assay. Residual polymer was explanted to determine the remaining dose of CFX. All animals remained healthy during the study. Local tissue reaction was mild and limited to the implantation site. Serum CFX concentrations remained low regardless of implant loading. Increased drug loading resulted in a higher and longer release of CFX in muscle and in bone. Local CFX concentrations were detected largely in excess of the MIC over 28 days with 20.0%-CFX implants. More residual CFX in polymer was detected over a longer period of time at high loading. These results strongly support the development of CLHAS implants for local antibacterial therapy.

2.4.2. Keywords

Controlled-release; Cross-linked starch; Implants; Ciprofloxacin; Local antibacterial therapy

2.4.3. Introduction

Cross-linked high amylose starch (CLHAS) was developed for controlled release solid oral dosage forms with a quasi zero order drug release over 12 to 24 hours [1,2]. As an implantable dosage form, an excellent biocompatibility of CLHAS upon subcutaneous and intramuscular implantation was demonstrated [3,4]. Ciprofloxacin (CFX) is a third generation fluoroquinolone with a broad spectrum of antibacterial activity and a good penetration in most tissues including bone [5-8]. Ciprofloxacin is very well distributed and concentrated within cells [8]. Fluoroquinolone agents have been increasingly and intensively developed and used during the last decade as a treatment of choice for major infections in hospitals [8]. The minimal inhibitory concentration (MIC) of CFX is low [8,9] for *Staphylococcus aureus* (0.5 µg/mL) which is the most commonly isolated pathogen in osteomyelitis [10,11]. Ciprofloxacin is also very efficient against most gram-negative

microorganisms such as Enterobacteriaceae that are also often responsible for bone infection, which requires a prolonged antibiotic therapy [11]. Until recently CFX has been the most widely used quinolone for a systemic treatment of bacterial osteomyelitis [12] and is considered to be appropriate for prevention and treatment of local bone and soft tissue infections [12-14]. *In vitro*, CLHAS was demonstrated to be an appropriate polymer for implantation as it enabled a steady and reproducible extended delivery of CFX over several days [15]. Therefore CLHAS implants containing CFX could represent a very interesting solution for the local prevention and/or treatment of osteomyelitis in orthopaedic surgeries.

In the present pharmacokinetic study, the objective was to characterize and compare the capacity of CLHAS implants with different loadings to release CFX locally in healthy rabbits.

2.4.4. Materials and methods

2.4.4.1. Materials

Ciprofloxacin HCl was kindly supplied by Betachem inc. (Upper Saddle River, NJ, USA), CLHAS (Contramid[®]) was provided by Labopharm inc. (Laval, QC, Canada) and hydrogenated vegetable oil (HVO) - Lubritab[®] - was purchased from Penwest Pharmaceuticals Co. (Patterson, NY, USA).

2.4.4.2. Preparation of implants

Dry CLHAS powder was blended with four different CFX loading levels (2.5, 7.5, 15.0 and 20.0 % w/w) and 0.5 % HVO (Table 1). Direct compression was performed as previously reported [15] to obtain 200 mg implants (diameter = 7.1 mm; thickness = 4.8 mm).

2.4.4.3. Animals

Sixty-four New Zealand white rabbits weighing 1.8 to 2.1 kg were used to evaluate systemic and local antibiotic release of CFX from CLHAS implants. Animals were randomly allotted into four treatment groups (2.5, 7.5, 15.0 and 20.0%-CFX group) corresponding to implant loadings, housed in individual cages and fed a standard antibiotic free laboratory diet and water *ad libitum* during all the study period. A 7-day period of acclimatization was applied before implantation.

2.4.4.4. Surgical procedure

Rabbits were anesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine hydrochloride (20 mg/kg BW) and acepromazine maleate (0.5 mg/kg BW). Anesthesia was maintained with isoflurane gas. The right hind leg was aseptically cleaned and surgically prepared. Systemic pre- and post-operative antibiotics were not used. Skin and lateral femoral fascia were incised to expose femur diaphysis. Since each rabbit was given a total dose ranging from 30 to 40 mg CFX, one to six CLHAS implants were administered depending on treatment groups (Table 1). Implants were placed between the quadriceps, the *biceps femoris* and the femur. The fascia and skin were closed separately with 3-0 Vicryl[®] suture (Ethicon inc., Markham, ON, Canada). Animals were monitored daily for systemic and local reactions. Blood samples were taken on days 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 and 28 for CFX assays. Four rabbits in each treatment group were euthanized by intra-cardiac injection of sodium pentobarbital on days 3 and 7 for 2.5 and 7.5%-CFX groups and on days 14, 21 and 28 for 2.5, 7.5, 15.0 and 20.0%-CFX groups. Macroscopic examination was performed for all groups. *Biceps femoris* and femur were collected for CFX assays and histological examination. Residual CFX in recovered CLHAS implants was also measured at several time points. All CFX assays in serum, muscle, bone and recovered implants were performed by HPLC. The HPLC procedure was developed by Cirion BioPharma Research Inc. (Laval, QC, Canada), using a C-18 reversed-phase column (Waters Ltd, Mississauga,

ON, Canada) and an elution with two mobile phases containing 5 % acetic acid and acetonitrile-methanol (80:20 v/v), respectively.

All procedures performed on animals were approved by the animal welfare and ethics committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, under the guidelines of the Canadian Council on Animal Care [16].

Table 1 : CFX-loaded CLHAS implants (200 mg) administered to rabbits.

Drug loading (%)	Implant nomenclature	Implant(s) / animal (n)	CFX / animal (mg)
2.5	2.5%-CFX	6	30
7.5	7.5%-CFX	2	30
15.0	15.0%-CFX	1	30
20.0	20.0%-CFX	1	40

2.4.4.5. Statistical analysis

Serum concentrations of CFX were tested using a repeated-measures one-way ANOVA test with time as a within-subject factor and treatment as a between-subject factor. Data on CFX concentrations in muscle and bone were subjected to two-way factorial ANOVA tests with treatments (2.5, 7.5, 15.0 and 20.0%-CFX implant) and time (3, 7, 14, 21 and 28 days) as main factors. *Post-hoc* Tukey's tests were used to examine differences between pairs of treatments at each time point. A *P* value of ≤ 0.05 was considered significant.

2.4.5. Results

2.4.5.1. Host response

All animals remained healthy with normal food and water intake as well as behaviour during the study. Neither systemic clinical signs of pain, distress or discomfort [17] nor local adverse reactions (pain, lameness, redness, edema, abscess formation or necrosis) were observed during the post-implantation period. Wound drainage occurred on day 10 in one animal which had removed its skin stitches. Post-mortem macroscopic inflammation was always mild and limited to muscle directly in contact with the implanted polymer. The femoral diaphysis directly exposed to CLHAS implants appeared macroscopically normal. The quantity of recovered implant material showed a time dependent decrease denoting a resorption. Microscopic observation revealed an inflammatory reaction always restricted to implant site. An influx of inflammatory cells to the implant site was observed with an infiltration of polymer by polymorphonuclear cells followed by macrophages surrounding the implant. Then neovascularization and fibrous septa developed within implants causing its fragmentation. An early mild muscle necrosis was noted, followed by a regeneration of myocytes in contact with polymer. Fibrosis around the implantation site remained mild over time.

2.4.5.2. Serum ciprofloxacin concentrations

Serum CFX concentrations are presented in Fig. 1. Statistical tests were performed only over the first week of the experiment in order to have a sufficient number of animals ($n \geq 7$) in each treatment group since rabbits were euthanized at each time point. A significant treatment:time interaction ($P = 0.04$) was observed indicating that serum concentrations of CFX varied differently over time in relation with drug loading in CLHAS implants. For all treatments, a non-linear time effect was observed ($P = 0.05$) indicating an increase and then a decrease of CFX concentrations over time. Concentrations of CFX were

significantly higher ($P = 0.02$) with 2.5 than with 7.5%-CFX implants. Comparing treatments by pair at each time point (Fig. 1), CFX concentrations were significantly higher ($P \leq 0.05$): * in 2.5%-CFX group than in 7.5%-CFX group on day 1 indicating an early serum peak of CFX with 2.5%-CFX implants; ** in 15.0%-CFX group than in 2.5%-CFX group and in 20.0%-CFX group than in 2.5 and 7.5%-CFX groups on day 5; *** in 15.0 and 20.0%-CFX groups than in 2.5 and 7.5%-CFX groups on day 7 indicating an extended and continuous delivery with the highest loadings.

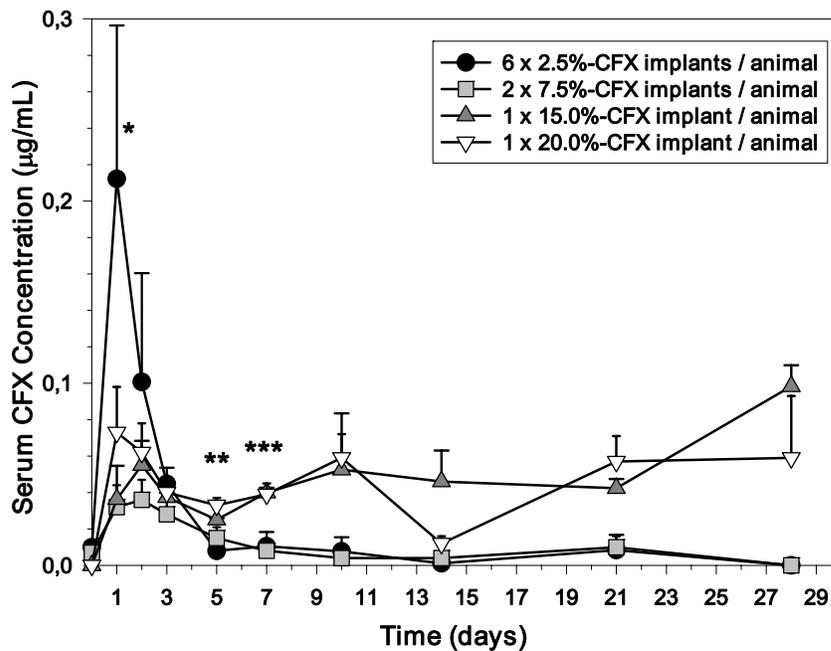


Figure 1 : Serum concentrations (mean \pm S.E.) of CFX after implantation of six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants / animal. Significant differences ($P \leq 0.05$) were observed: * 2.5%-CFX group versus 7.5%-CFX group at day 1; ** 2.5%-CFX group versus 15.0 and 20.0%-CFX groups and 7.5%-CFX group versus 20.0%-CFX group at day 5; *** 2.5 and 7.5%-CFX groups versus 15.0 and 20.0%-CFX groups at day 7.

Other comparisons were not significantly different ($P > 0.05$). Moreover, CFX concentrations in serum for all formulations remained largely below the *S. aureus* MIC (0.5 µg/mL) over 28 days.

2.4.5.3. Muscle ciprofloxacin concentrations

Duration of CFX release was prolonged with an increasing drug loading in CLHAS implants. Concentrations of CFX were detected in muscle over 21 days in 2.5 and 7.5%-CFX groups and 28 days in 15.0 and 20.0%-CFX groups, respectively (Fig. 2).

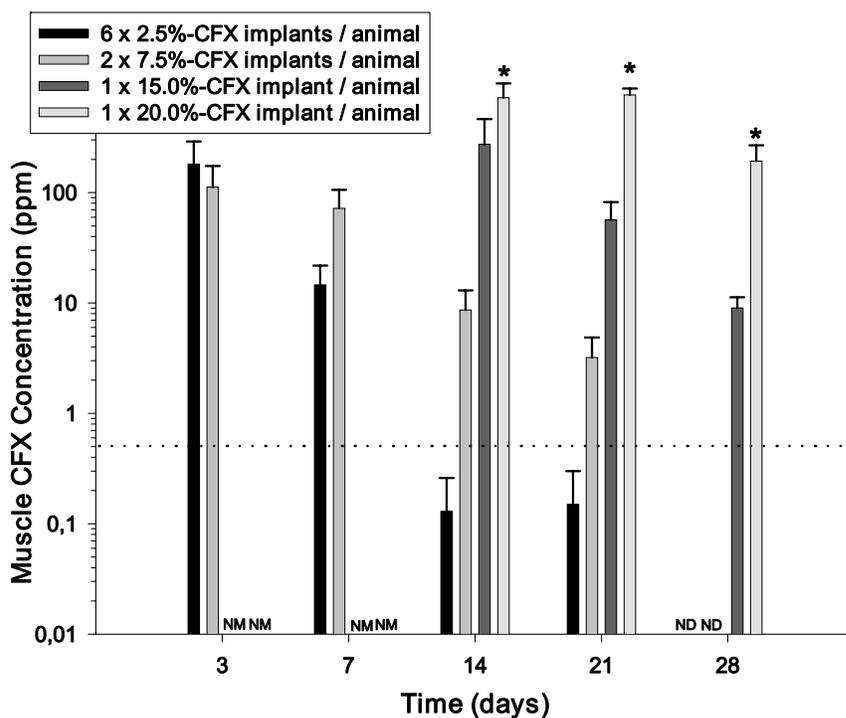


Figure 2 : Muscle concentrations (mean \pm S.E.) of CFX after implantation of six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants / animal (* $P \leq 0.05$ for comparisons between treatment groups at a similar time point). MIC for *S. aureus* is represented by the dotted line; $n = 4$ animals / column; NM: Not Measured; ND: Not Detected.

Concentrations were higher than the *S. aureus* MIC for 7 days with 2.5%-CFX implants, 21 days with 7.5%-CFX implants and 28 days with both 15.0 and 20.0%-CFX implants. Moreover, CFX concentrations were always higher with 20.0%-CFX implants than with 15.0%-CFX implants. A significant treatment:time interaction ($P = 0.03$) was observed denoting that muscle CFX concentrations varied differently over time in relation to the drug loading in CLHAS implants. With *post-hoc* Tukey's contrasts, CFX concentration in muscle was significantly higher ($P \leq 0.05$) 1) in 20.0%-CFX group than in 2.5 and 7.5%-CFX groups on day 14 and 2) in 20.0%-CFX group than in all other groups on days 21 and 28. All other contrasts were not statistically significant ($P > 0.05$).

2.4.5.4. Bone ciprofloxacin concentrations

Concentrations of CFX were detected in bone over 14 and 21 days in 2.5 and 7.5%-CFX groups, respectively and over 28 days in both 15.0 and 20.0%-CFX groups (Fig. 3). Concentrations were higher than *S. aureus* MIC for 7 days in 2.5 and 7.5%-CFX groups, and 28 days in 15.0 and 20.0%-CFX groups. Concentrations in bone were lower than in muscle for each given loading and time point. Release duration for 2.5%-CFX implants was shorter in bone than in muscle (14 versus 21 days). Bone concentrations varied significantly as a function of treatment ($P < 0.01$) and time ($P = 0.02$) without an interaction between the two factors ($P = 0.22$). With *post-hoc* Tukey's contrasts, CFX concentration in bone was significantly higher ($P \leq 0.05$) with 15.0 and 20.0%-CFX implants than with 2.5 and 7.5%-CFX implants on day 28. All other contrasts were not statistically significant ($P > 0.05$).

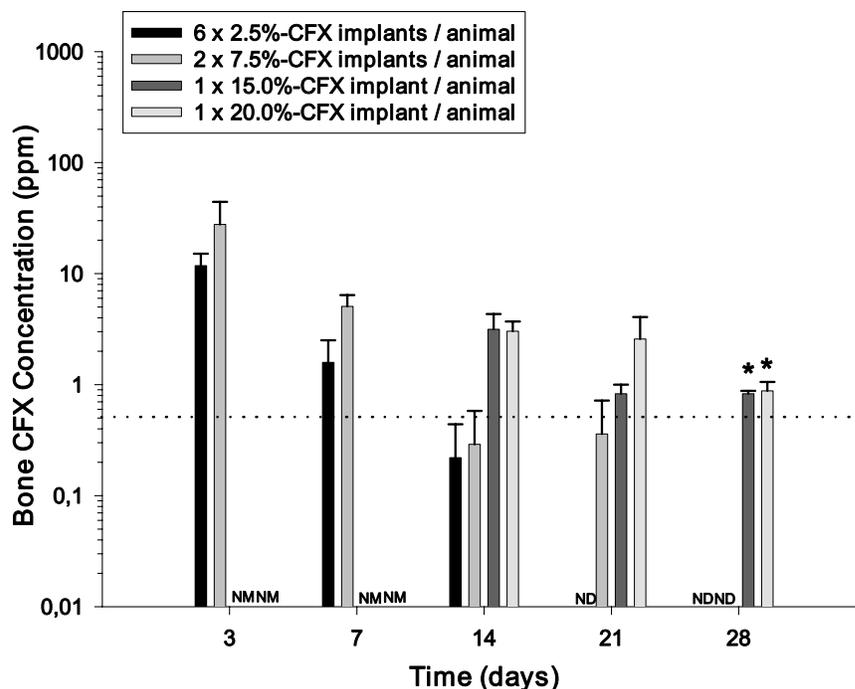


Figure 3 : Bone concentrations (mean \pm S.E.) of CFX after implantation of six 2.5, two 7.5, one 15.0 or one 20.0%-CFX implants / animal (* $P \leq 0.05$ for comparisons between treatment groups at a similar time point). MIC for *S. aureus* is represented by the dotted line; $n = 4$ animals / column; NM: Not Measured; ND: Not Detected.

2.4.5.5. Residual ciprofloxacin in implants

The amount of CFX remaining in CLHAS implants is presented in Table 2. Residual CFX on day 3 was not measured. Measurements on day 7 were not performed in 15.0 and 20.0%-CFX groups. Residual polymer was more dispersed after administration of two and six implants (2.5 and 7.5%-CFX groups) than of one implant (15.0 and 20.0%-CFX groups). For this reason, extraction of all material was not reliable for 2.5 and 7.5%-CFX groups. Hence, in these two groups, CFX in the polymer was considered positive or negative (Table 2). Residual CFX in recovered CLHAS implants was detected at 7, 21 and

28 days in 2.5, 7.5 and both 15.0 and 20.0%-CFX groups, respectively. The percentage of CFX in 15.0 and 20.0%-CFX implants decreased similarly with time.

Table 2 : Residual CFX in recovered CLHAS implants (NM: Not Measured; ND: Not Detected).

Day	2.5%-CFX implant ^a	7.5%-CFX implant ^a	15.0%-CFX implant ^b	20.0%-CFX implant ^b
7	+	+	NM	NM
14	ND	+	71.3 ± 9.9 %	65.7 ± 16.8 %
21	ND	+	20.9 ± 14.0 %	22.3 ± 10.8 %
28	ND	ND	6.1 ± 2.4 %	6.1 ± 3.4 %

^a Due to unreliable extraction of all material, quantification of residual CFX was not possible in positive samples.

^b Percent mean ± S.D. of the initial implant loading.

2.4.6. Discussion

In the present study, biocompatibility and resorption of CLHAS were demonstrated in rabbits which is a particularly sensitive species. Inflammatory response to CLHAS has been previously studied after implantation in mice [3] and rats [4]. This modified starch was characterized as a biocompatible polymer in both species. Host reaction in rabbits after intramuscular implantation was macroscopically and microscopically similar to the one observed in mice [3] and particularly in rats [4] in which intramuscular implantation was performed and excellent biocompatibility was observed. Indeed, successive steps of CLHAS microscopic reaction in rabbits were qualitatively and chronologically similar to those previously described with intramuscular implantation in rats [4].

Implantation of drug delivery systems for localized therapy is sometimes used to avoid systemic drug toxicity [18]. It has an important safety advantage since the potential drug systemic toxicity is kept at a minimum as a result of low serum concentrations. This purpose was achieved by CLHAS implants. Indeed, even the highest serum peak obtained with 2.5%-CFX implants at day 1, was below the toxic level since the systemic therapeutic concentration (MIC) was not reached. In accordance with *in vitro* results [15], a better control of initial burst effect and a more reproducible profile in serum over the first week were obtained with the 7.5 versus the 2.5%-CFX group. This trend was confirmed with 15.0 and 20.0%-CFX groups. However, this might be explained by the fact that a smaller interface was available for drug diffusion and host reaction with one (15.0 and 20.0%-CFX groups) or two (7.5%-CFX group) implants than with six implants (2.5%-CFX group). In addition, increased implant loadings allowed a more steady delivery of CFX over time, characterized by a plateau serum profile.

As observed *in vitro* [15], 2.5 and 7.5%-CFX implants released CFX in muscle over 21 days despite host reaction and CLHAS degradation versus time. Compared with previous *in vitro* data [15], these results provided a good *in vitro* / *in vivo* correlation for further studies with CLHAS implants. Additionally, duration of CFX release was prolonged with increased drug loading level. Indeed, 15.0 and 20.0%-CFX implants enabled CFX concentrations in muscle in excess of bacterial MIC over at least 28 days. Consequently, CFX delivery profile from 20.0%-CFX implants appeared to be the most appropriate for use in local antibiotic therapy with low initial systemic concentrations and a long local release duration at the highest concentration. These positive results justify further studies of the efficacy of CFX-loaded CLHAS implants.

Concentrations of CFX were always lower in bone than in muscle. Bone concentrations were lower than the *S. aureus* MIC at days 14, 21 and 28 for the 2.5 and 7.5%-CFX implants. However in the present study, periosteum and femur were left intact, possibly reducing drug diffusion in bone. Drug penetration in bone is expected to be much

better following a clinical orthopaedic surgery. It is likely that bone concentrations obtained in the present study represented an overall CLHAS implant diffusion in the leg and not a direct elution in bone tissue by contact as would occur with an intra-osseous implant in a clinical situation. Therefore results with 15.0 and 20.0%-CFX implants are encouraging since despite this limitation, these formulations provided CFX concentrations in femur higher than the MIC for a period of at least 28 days.

Bone concentrations of CFX in all treatment groups on day 14 were lower than those previously reported with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres [14] because in the latter study, the initial dosage was 2.5 times higher (100 versus 30-40 mg CFX per animal) and the implants were inserted in the bone. However bone concentrations were more reproducible with CLHAS implants than with PLGA microspheres. Considering all these factors, CFX concentrations obtained in the present study were promising for further experiments with an osteomyelitis model in which local high and sustained antibacterial concentrations are required.

Excellent results with quinolones have been reported in the treatment of experimental osteomyelitis with or without the presence of a foreign body [12]. Prolonged oral therapy with fluoroquinolones, alone or combined with another antimicrobial agent, is a current management strategy for treatment of chronic osteomyelitis in humans [5,13,19-21]. However, none of the existing quinolones allows an optimal coverage against staphylococcal bone infection when administered alone orally [21]. Implanted devices impregnated with quinolones have been shown to provide high therapeutic concentrations locally in animal models [12]. Therefore, CLHAS implants as reported in the present study should satisfy the requirements for a local antimicrobial treatment.

Muscle and bone CFX concentrations in 15.0 and 20.0%-CFX groups were intentionally not measured on days 3 and 7. Measurement was judged unnecessary since the purpose of the study was to evaluate the extension of delivery time with increasing loading. Serum CFX concentrations were similar in all groups on day 3 and significantly higher in

15.0 and 20.0%-CFX groups on day 7. Hence we assumed that local CFX concentrations in these two high loading groups were largely in excess of MIC on days 3 and 7. Accordingly, fewer animals were used in compliance with recommendations by the Canadian Council on Animal Care [16].

The percentage of residual CFX in 15.0 and 20.0%-CFX implants decreased with a similar rate over time. In a same manner, it has been shown *in vitro* that after 48 h, CFX release rate was similar over several days regardless of drug loading [15]. Remaining CFX in recovered implants confirmed results obtained with muscle and bone concentrations indicating an increase of release time with increasing loading. With a residual amount around 6 % of the initial dose in 15.0 and 20.0%-CFX implants on day 28, these CLHAS implants are clearly effective for more than 4 weeks, which would be appropriate for the treatment of chronic osteomyelitis. Indeed, drainage and debridement are usually required along with 4-6 weeks antimicrobial therapy because revascularization of bone requires 3-4 weeks [21].

The difference in release rate observed between formulations with different loadings cannot be explained by a variation of implant hardness. Firstly, all *in vivo* tested CLHAS implants were manufactured with a similar compression force (17 kN) and had similar crushing strengths. Secondly, it has been previously demonstrated that crushing strength, *in vitro* enzymatic α -amylase erosion and drug release of CLHAS tablets are not affected by compression force when this latter is superior to 6 kN [22]. Although a swelling – diffusion mechanism [1,2,23] controls drug release from CLHAS matrix, a degradation – erosion by macrophages occurs additionally *in vivo* [3,4]. The effect of these inflammatory cells was basically the same on all formulations tested in the present study.

2.4.7. Conclusions

In addition to an excellent biocompatibility and bioresorption, the biofunctionality of CLHAS implants has been demonstrated in the present study based on high local drug

concentrations along with low systemic distribution. Increasing CFX loading in CLHAS implants resulted in a prolonged release and a well-controlled initial burst effect. Delivery profile of CFX with 20.0%-CFX implants appeared to be the best of all formulations tested and would be appropriate for the intended use in local antibacterial therapy. Cross-linked high amylose starch matrix implants containing ciprofloxacin have a considerable potential as a parenteral controlled delivery system for local prevention and treatment of bone and soft tissue infections.

2.4.8. Acknowledgements

We wish to thank Guy Beauchamp for his valuable assistance in statistical tests on data.

2.4.9. References

- [1] V. Lenaerts, Y. Dumoulin, M.A. Mateescu, Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets, *J. Control. Release* 15 (1991) 39-46.
- [2] V. Lenaerts, I. Moussa, Y. Dumoulin, F. Mebsout, F. Chouinard, P. Szabo, M.A. Mateescu, L. Cartilier, R. Marchessault, Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances, *J. Control. Release* 53 (1998) 225-234.
- [3] C. Désévaux, C. Girard, V. Lenaerts, P. Dubreuil, Characterization of subcutaneous Contramid[®] implantation: host response and delivery of a potent analog of the growth hormone-releasing factor, *Int. J. Pharm.* 232 (2002) 119-129.
- [4] C. Désévaux, P. Dubreuil, V. Lenaerts, C. Girard, Evaluation of tissue reaction and biodegradation of implanted cross-linked high amylose starch in rats, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* (2002) In press.

- [5] N. Desplaces, J. F. Ascar, New quinolones in the treatment of joint and bone infections, *Rev. Infect. Dis.* 10 Suppl. 1 (1988) S179-S183.
- [6] L.R. Gill, K.J. Mayberry-Carson, B. Tober-Meyer, F. Hodin, D.W. Lambe, B.G. Painter, Ciprofloxacin concentrations in serum, bone and bone marrow of rabbits, *Microbios* 58 (1989) 113-126.
- [7] A. Sanchez-Navarro, A.C. Casquero-Dorado, M. Weiss, Distribution and binding kinetics of ciprofloxacin and ofloxacin in the hindlimb of the rat, *Pharm. Res.* 16 (1999) 587-591.
- [8] R. Wise, Future management of serious infections with quinolones, *Clin. Drug. Invest.* 15 (1998) 39-46.
- [9] D.C. Hooper, Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones, *Clin. Infect. Dis.* 31 Suppl. 2 (2000) S24-S28.
- [10] F.H. Kayser, H. Eberle, Bacterial aspects of chronic posttraumatic osteomyelitis in: J.G. van Rens, F.H. Kayser (Eds), *Local Antibiotic Treatment in Osteomyelitis and Soft Tissue Infections*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1981, pp. 1-7.
- [11] J.T. Mader, G.C. Landon, J. Calhoun, Antimicrobial treatment of osteomyelitis, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 295 (1993) 87-95.
- [12] D.P. Lew, F.A. Waldvogel, Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis, *Drugs* 58 (1999) 85-91.

- [13] J.T. Mader, J.S. Cantrell, J. Calhoun, Oral ciprofloxacin compared with standard parenteral antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults, *J. Bone Joint Surg.* 72 (1990) 104-110.
- [14] M. Ramchandani, D. Robinson, In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants, *J. Control. Release* 54 (1998) 167-175.
- [15] C. Désévaux, P. Dubreuil, V. Lenaerts, Characterization of cross-linked high amylose starch matrix implants. 1. *In vitro* release of ciprofloxacin, *J. Control. Release* 82 (2002) 83-93.
- [16] E.D. Olfert, B.M. Cross, A.A. McWilliam, *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, Vol. 1, Canadian Council on Animal Care, Ottawa, ON, 1993.
- [17] D.B. Morton, P.H.M. Griffiths, Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment, *Vet. Rec.* 116 (1985) 431-436.
- [18] R. Langer, New methods of drug delivery, *Science* 249 (1990) 1527-1533.
- [19] R.N. Greenberg, D.J. Kennedy, P.M. Reilly, K.L. Luppen, W.J. Weinandt, M.R. Bollinger, F. Aguirre, F. Kodesch, A.M.K. Saeed, Treatment of bone, joint, and soft-tissue infections with oral ciprofloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 (1987) 151-155.
- [20] R.N. Greenberg, A.D. Tice, P.K. Marsh, P.C. Craven, P.M. Reilly, M. Bollinger, W.J. Weinandt, Randomized trial of ciprofloxacin compared with other antimicrobial therapy in the treatment of osteomyelitis, *Am. J. Med.* 82 Suppl. 4A (1987) 266-269.

- [21] J.P. Rissing, Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: Role of the quinolones, *Clin. Infect. Dis.* 25 (1997) 1327-1333.
- [22] M. Rahmouni, F. Chouinard, F. Nekka, V. Lenaerts, J.C. Leroux, Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on *in vitro* release of sodium diclofenac, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51 (2001) 191-198.
- [23] I.S. Moussa, L.H. Cartilier, Characterization of moving fronts in cross-linked amylose matrices by image analysis, *J. Control. Release* 42 (1996) 47-55.

3. Discussion générale

3.1. Propriétés de biocompatibilité des implants Contramid®

Il est toujours primordial de déterminer le type, la durée et l'amplitude de la réponse de l'hôte afin d'établir la biocompatibilité d'un matériau. Après implantation d'un biomatériau, les étapes de la réponse locale sont chronologiquement une inflammation aiguë suivie d'une phase chronique, un tissu de granulation, une réaction à corps étranger et une fibrose (Anderson, 1994a). Les phases aiguë et chronique sont caractérisées notamment par la présence prédominante respective de neutrophiles précaires et de macrophages persistants. Cependant l'intensité et la durée de ces étapes varient en fonction du matériau de l'implant testé. Au cours des différentes études d'histocompatibilité menées chez la souris, le rat et le lapin, la séquence temporelle des événements locaux observés à la suite de l'administration d'implants, a démontré une excellente biocompatibilité du Contramid® chez ces espèces.

3.1.1. Biocompatibilité chez la souris

3.1.1.1. Avant-propos

L'étude chez la souris est la première du genre pour évaluer la biocompatibilité du Contramid®. En effet, ces travaux rapportent pour la première fois l'implantation de ce polymère polysaccharidique et la réaction inflammatoire qui y est associée chez cette espèce.

L'expérience pour étudier spécifiquement la biocompatibilité du Contramid® sous forme d'implant solide administré par voie sous-cutanée, a été faite chez la souris pour faciliter l'évaluation de la réaction locale, la récupération de l'implant et les lectures histologiques sur une période de six mois. Chez le porc, le suivi de la réponse locale de

l'hôte aurait été plus fastidieux et la récupération de l'implant beaucoup plus aléatoire, voire impossible.

3.1.1.2. Observations macroscopiques

En ce qui concerne les observations macroscopiques, un œdème de 5 mm au niveau du site d'implantation, a été noté chez tous les animaux pendant la première semaine qui a suivi la mise en place de l'implant. Cette observation est considérée comme un reflet des propriétés physico-chimiques de la matrice polymère (Lenaerts et coll., 1998). En effet, le Contramid[®] est un hydrogel appelé à s'imbibier du fluide environnant, provoquant un gonflement de l'implant qui, en région sous-cutanée, peut être perçu comme un œdème. Plusieurs points permettent d'avancer cette hypothèse comme explication. Le Contramid[®] est un polysaccharide hydrophile qui gonfle en directions radiale et axiale (Moussa et Cartilier, 1996). Cependant le gonflement le plus important et le plus rapide se fait en direction axiale (Moussa et Cartilier, 1996). De plus, le gonflement du Contramid[®] s'effectue partiellement, en quelques minutes *in vitro*, dans la première étape de l'hydratation de l'hydrogel (Moussa et coll., 1998a). On peut penser que ce procédé existe aussi *in vivo* et qu'il débiterait immédiatement après l'implantation. Le pourcentage du gonflement final *in vivo* peut être aussi important que celui *in vitro* mais il ne peut être atteint aussi rapidement. En effet, la vitesse de gonflement est probablement moindre *in vivo* parce que la quantité de fluide disponible autour de la matrice est plus restreinte par rapport aux conditions *in vitro*. De plus, des comprimés de Contramid[®] ont montré un gonflement moindre dans le PBS que dans l'eau distillée, atteignant l'équilibre seulement au bout de 24 heures (Ravenelle et coll., 2002). Ces différents arguments permettent d'expliquer l'apparition de l'œdème après 24 heures d'implantation. Enfin, les trois autres signes cliniques de l'inflammation aiguë (rougeur, chaleur et douleur) n'étaient pas présents au site d'implantation pendant la durée de l'œdème (Cotran et coll., 1994 ; Tizard, 1996), écartant ainsi l'origine traumatique de ce dernier.

Un écoulement est apparu au site d'implantation chez 5 souris sur 70 (incidence d'environ 7 %). Cet événement est plus attribuable au trauma de l'intervention chirurgicale qu'à l'implant lui-même. Effectivement, les observations macroscopiques et microscopiques des implants chez les souris présentant un écoulement, étaient identiques à celles des autres animaux. Ce genre de complication est un facteur de risque toujours possible au niveau d'une incision chirurgicale avec des fils de sutures.

3.1.1.3. Observations microscopiques

Les observations microscopiques ont démontré avant tout une excellente biocompatibilité des implants Contramid[®]. Ces résultats vont de pair avec ceux des microsphères d'amidon administrées par voie parentérale (Arfors et coll., 1976 ; Björk et coll., 1991 ; Dakhil et coll., 1982 ; Forsberg, 1978). Les microsphères administrées par voie nasale chez le lapin ont montré une bonne biocompatibilité au contact de la muqueuse (Björk et coll., 1991). Ces mêmes microsphères injectées par voie intra-artérielle ont fait preuve d'une excellente biocompatibilité chez le rat (Forsberg, 1978), le porc (Arfors et coll., 1976) et l'Homme (Dakhil et coll., 1982), en partie grâce à une biodégradation possible par l' α -amylase sérique permettant leur élimination.

Les macrophages se sont révélés être les principaux protagonistes de la réaction en réponse à l'implantation du Contramid[®]. Ce type de cellule inflammatoire a prédominé dès la fin de la première semaine après l'implantation, et ce jusqu'à la fin de l'étude (6 mois). Cette observation peut aller à l'encontre de la notion de la biocompatibilité d'un matériau. En fait, l'accumulation des macrophages était élevée mais elle est toujours restée très localisée au site où se trouvait le polymère, révélant ainsi l'accomplissement d'une activité spécifique sur l'implant comme celle de sa dégradation. Il est reconnu que les macrophages peuvent rester à l'interface des implants pendant de longues périodes sans pour autant compromettre la biocompatibilité des matériaux en question (Anderson et Miller, 1984). Aussi, il a été établi *in vitro* que les macrophages sont activés par les microparticules de

polysaccharides dont l'amidon, mais à un moindre degré (Artursson et coll., 1987a ; Artursson et coll., 1989). Cependant les microparticules d'amidon n'ont pas d'effet sur l'activité cytotoxique des macrophages qui pourrait créer des dommages aux tissus avoisinants (Artursson et coll., 1987b). Dans l'étude avec les souris, l'aspect spumeux du cytoplasme des macrophages dès le 14^{ème} jour après l'implantation, dénote une activité phagocytaire certainement activées par la présence de l'amidon du Contramid[®]. Par ailleurs, toute la couronne de macrophages autour de l'implant est colorée en magenta par l'acide périodique-Schiff (PAS) indiquant une dégradation possible du Contramid[®] et une phagocytose des débris polysaccharidiques par ces cellules. De plus, la quantité de matériel positif au PAS (intra et extracellulaire) diminue avec le temps révélant une éventuelle érosion du polymère.

Le processus de guérison au site d'implantation débute dès une semaine après la mise en place de l'implant Contramid[®]. Elle commence effectivement par l'apparition et la prolifération de fins septums fibrovasculaires qui envahissent l'implant. La réaction à corps étranger avec l'implant Contramid[®] se traduit essentiellement par la présence de nombreux macrophages qui sont venus dégrader, phagocyter et résorber le polymère. L'omniprésence des macrophages rend plus difficile la distinction des étapes séquentielles citées antérieurement (Anderson, 1994a). Ce phénomène pourrait même biaiser la conclusion de l'évaluation pour un œil non averti, envers une mauvaise biocompatibilité du Contramid[®]. Quelques cellules géantes multinucléées apparaissent six mois après l'implantation, alors que la fibrose autour des implants est toujours restée minimale tout au long de l'étude. La poudre de Contramid[®] est formée de particules sphériques effondrées de forme et de dimension hétérogènes (Hancock et coll., 2001 ; Le bail et coll., 1999). La compression de cette poudre donne des implants Contramid[®] caractérisés par une microporosité avec une surface spécifique élevée (Moussa et coll., 1998b). Une porosité optimale permet une meilleure invasion vasculaire du polymère (Mohanty et coll., 1992 ; Ratner, 2002 ; Salzman et coll., 1997 ; Sharkawy et coll., 1998). Une faible fibrose et une

néovascularisation à l'interface de l'implant sont deux critères cruciaux pour un système à libération contrôlée (Ratner, 2002), qui devraient permettre la bonne diffusion d'une substance depuis l'intérieur de l'implant vers les tissus adjacents et vice versa (Sharkawy et coll., 1997), associée à un échange entre les tissus et le plasma (Sharkawy et coll., 1998). En effet, la fibrose dense et le manque de vascularisation autour d'un implant correspondent à l'encapsulation, véritable barrière à tout transport de molécule entre l'implant et les tissus avoisinants (Ratner, 2002). Cette barrière ne s'est pas formée avec un implant Contramid[®] en région sous-cutanée chez la souris.

3.1.2. Biocompatibilité chez le rat

3.1.2.1. Observations macroscopiques

Tout au long du suivi clinique de quatre mois, il n'a été noté ni réaction systémique adverse, ni signe d'inflammation locale aux différents sites d'implantation. Avec un épiderme et un derme plus épais chez le rat, le gonflement de l'implant n'a pas été observé comme chez la souris. Au moment des prélèvements post-mortem après dissection des sites d'implantation, aucune réaction inflammatoire n'était apparente avec les implants Contramid[®], contrairement aux observations macroscopiques faites chez la souris, qui décrivaient une néovascularisation et une légère fibrose. Cette absence de réaction macroscopique chez le rat, a causé quelques difficultés au moment du prélèvement du polymère pour les examens histopathologiques. En effet, l'implant Contramid[®] n'a pas été retrouvé à deux reprises. Au bout de quatre mois, seule une petite cicatrice fibreuse à peine visible pouvait être observée au site d'implantation, dévoilant déjà ainsi le caractère biodégradable du Contramid[®].

3.1.2.2. Observations microscopiques

De manière générale, la séquence des événements inflammatoires suite à l'implantation du Contramid[®] chez le rat, était identique à celle observée auparavant chez la souris. En fait, la description de la réponse de l'hôte envers le Contramid[®] correspond aux phases principales de réaction inflammatoire à corps étranger qui se développe à la suite de l'implantation d'un dispositif biocompatible (Anderson, 1994a et 1994b ; Cotran et coll., 1994 ; Woodward, 1999) :

- o La phase aiguë se caractérise par un exsudat tissulaire et une accumulation de polymorphonucléaires. Cette phase se déroule essentiellement au cours de la première semaine après l'implantation.
- o La phase subaiguë se caractérise par une accumulation progressive de macrophages et une prolifération de fibroblastes et de cellules endothéliales. Cette phase se déroule principalement au cours de la deuxième semaine qui suit l'implantation.
- o La phase chronique se caractérise généralement par une dégradation de l'implant avec la présence de macrophages et/ou de cellules géantes multinucléées.

Il est vrai que le déroulement de ces événements varie en fonction des caractéristiques du matériau implanté. L'évolution vers une dégradation et/ou une encapsulation de ce dernier se fait alors à différents degrés. Effectivement, les propriétés physico-chimiques du matériau, la forme et la taille de l'implant, l'intensité de la réponse de l'hôte et le degré du traumatisme causé par l'implantation sont autant de facteurs qui ont une influence sur la vitesse de dégradation – érosion d'un matériau (Anderson, 1994a et 1994b ; Anderson et Shive, 1997 ; Jansen et coll., 1994 ; Woodward, 1999). Toujours est-il que les étapes précédemment citées, se déroulent en général et s'appliquent au Contramid[®]. Elles ont d'ailleurs été rapportées avec différents polymères comme les polyesters, les polyanhydrides et les POE (Bernatchez et coll., 1993 ; Beumer et coll., 1994 ; Holder et

coll., 1998 ; Hooper et coll., 1998 ; Ibim et coll., 1998), qui sont tous reconnus actuellement comme des matériaux biocompatibles et biodégradables.

Une fibrose minime est apparue avec le temps, à la périphérie de l'implant Contramid[®]. Elle est caractérisée par un faible tissu conjonctif lâche peu abondant et bien vascularisé. Parallèlement, de fins septums fibrovasculaires ont rapidement envahi et subdivisé l'implant Contramid[®]. Ces événements ont déjà été observés chez la souris. De la même manière, une infiltration fibrovasculaire précoce et une fine capsule fibreuse périphérique s'étaient développées avec des implants poreux PLA, PGA (Holder et coll., 1998) et PLGA (Lu et coll., 2000). Après compactage direct de la poudre de Contramid[®], la matrice solide obtenue est poreuse (Moussa et coll., 1998b ; Rahmouni et coll., 2002). Après gonflement dans un milieu tampon, la matrice gélifiée est encore poreuse et se comporte comme une éponge à travers laquelle le fluide est capable d'entrer et sortir sous l'action de forces mécaniques externes (Ravenelle et coll., 2002). Habituellement, l'implantation d'un matériau poreux n'entraîne pas le développement d'une capsule fibreuse dense (Anderson, 1994a ; Mohanty et coll., 1992 ; Ratner, 2002). Parallèlement, une meilleure invasion vasculaire a lieu au sein du matériau (Ratner, 2002 ; Salzman et coll., 1997 ; Sharkawy et coll., 1998). En faisant office de séparation étanche entre l'implant et l'hôte, la capsule fibreuse risque de nuire à la performance *in vivo* des systèmes à libération contrôlée. C'est pourquoi, pour cette catégorie d'implants, les objectifs de biocompatibilité sont une diminution de l'épaisseur de la capsule fibreuse et une augmentation de l'angiogenèse périphérique (Ratner, 2002). Par conséquent, les caractéristiques de la réaction de l'hôte envers le Contramid[®], sont favorables pour l'utilisation de ce polymère sous la forme d'un implant à libération contrôlée.

L'observation microscopique a montré une dégradation – érosion du Contramid[®] plus rapide chez le rat que chez la souris. Cette différence de vitesse de résorption du polymère est principalement due à la variation de réaction entre les espèces animales. Ce

phénomène a déjà été rapporté auparavant en comparant les temps de résorption du Catgut® chez le rat, le lapin et le chien (Sewell et coll., 1955).

Outre la vitesse de résorption du Contramid®, le type de guérison tissulaire chez le rat s'est différencié de celui de la souris. En effet, des adipocytes sont apparus au site d'implantation chez le rat, au lieu de la légère fibrose cicatricielle observée chez la souris. Il est fort peu probable que cette évolution corresponde à un lipome post-traumatique (Signorini et Campiglio, 1998) car le tissu adipeux présent était tout à fait normal d'un point de vue histologique et ne s'étendait point en dehors du site d'implantation. Plusieurs facteurs de croissance ou médiateurs inflammatoires associés à la réaction inflammatoire, peuvent déclencher la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures (Ailhaud, 1982 et 1997 ; Butterwith, 1997 ; Levine et coll., 1998 ; Shillabeer et coll., 1998 ; Signorini et Campiglio, 1998). De plus, l'apparition d'adipocytes a été déjà rapportée chez le rat, avec l'implantation de grillages en titane implantés (Jansen et coll., 1994).

D'une certaine manière, la compatibilité du Contramid® a aussi par rapport aux cellules, été testée dans cette étude, grâce à l'implantation intramusculaire. Des myocytes nécrotiques ont été observés juste après l'implantation. La régénération des cellules musculaires dans les jours qui suivent, en présence de Contramid®, laisse présager que le polymère n'est pas responsable de cette dégénérescence. En effet, la capacité de régénération des myocytes au contact du Contramid® indique plutôt que ce dernier ne libère pas localement, de sous-produits de dégradation toxiques. Ces résultats corroborent l'absence de cytotoxicité *in vitro* des mélanges polymères à base d'amidon (Mendes et coll., 2001).

Finalement, les observations microscopiques permettent de conclure que le Contramid® se caractérise non seulement par une excellente biocompatibilité, mais aussi par une capacité de biodégradation et de biorésorption sans aucune complication. En effet, quatre mois après implantation, la quantité de matériau positif au PAS est minimale.

3.1.2.3. Généralités

Cette étude chez le rat, a démontré une excellente biocompatibilité du Contramid[®]. En effet, il est reconnu que l'implantation sous-cutanée d'un matériau avec une évaluation histologique des phénomènes chronologiques de l'inflammation et de la guérison, permet d'établir le degré de biocompatibilité des implants à libération contrôlée (Anderson, 1994b). Outre le fait que ces observations chez le rat confirment celles précédemment faites chez la souris, elles démontrent clairement et avant tout, que le Contramid[®] est un matériau résorbable lorsqu'il est implanté en régions sous-cutanée et intramusculaire.

L'évolution du Contramid[®] et la réponse de l'hôte ne diffèrent pas en fonction du site d'implantation (sous-cutané ou intramusculaire). Ce point apporte d'autant plus de poids à la biocompatibilité du Contramid[®]. De la même manière, aucune différence n'a pu être observée dans la dégradation d'implants PLA sous-cutanés et intramusculaires chez le lapin (Nakamura et coll., 1989) et le rat (Leach et coll., 1998).

Comme la réaction inflammatoire au site de contrôle était minime et éphémère, le traumatisme causé par la procédure chirurgicale que requiert l'implantation, n'était donc pas significatif. Cette déduction n'est valable que pour l'implantation sous-cutanée puisqu'il n'y a pas eu de site témoin au niveau musculaire. Un tel site aurait été intéressant parce que le traumatisme chirurgical de l'implantation peut être plus important dans le tissu musculaire que dans le tissu conjonctif sous-cutané. Cet argument semble se confirmer quand on considère la dégénérescence transitoire des cellules musculaires juste après l'implantation.

Chez la souris, l'inflammation causée par l'incision et la suture du plan cutané, s'était avérée plus sévère à l'observation macroscopique que celle causée par la présence de l'implant Contramid[®]. C'est pourquoi, pour limiter une éventuelle interaction de

l'inflammation entre la plaie chirurgicale et les sites d'implantation, plusieurs précautions ont été prises chez le rat :

- o Le nombre de plaies a été limité à une seule incision sur le dos de l'animal, pour les deux sites d'implantation sous-cutanée (témoin et Contramid®).
- o Une distance raisonnable entre la plaie chirurgicale et les deux sites d'implantation, a été maintenue grâce au tunnel sous-cutané de 5 cm. Par la même occasion, le site de contrôle ne contenait pas le lieu d'incision.
- o L'inflammation causée par les sutures a été minimisée avec un fil en Nylon non résorbable, reconnu pour causer très peu de réaction (Giardino et coll., 1992).

Ainsi, ces conditions ont assuré non seulement une évaluation plus fiable de la réaction causée par l'implant Contramid® même, mais aussi un meilleur jugement de l'effet du trocart au cours de l'implantation en région sous-cutanée.

3.1.3. Biocompatibilité chez le lapin

Dans cette étude, la biocompatibilité et la dégradation – érosion du Contramid® déjà démontrées chez la souris et le rat, a été confirmée chez le lapin. Ces résultats positifs sont très encourageants pour l'avenir du Contramid® en tant que biomatériau parce que le lapin est connu comme étant une espèce sensible aux réactions. Aux examens macroscopique et microscopique, la réaction inflammatoire après implantation au contact du tissu musculaire chez le lapin était similaire à celle observée précédemment chez le rat où le Contramid® avait également été placé en région intramusculaire. À l'observation macroscopique, la réaction inflammatoire est restée minime tout au long de l'étude et se limitait uniquement au muscle en contact direct avec le polymère. Parallèlement, la quantité de polymère retrouvée au site d'implantation diminuait avec le temps. À l'évaluation microscopique, les étapes successives de la réaction inflammatoire (Anderson, 1994a) envers le Contramid® étaient qualitativement et chronologiquement comparables à celles observées précédemment lors d'implantation intramusculaire chez le rat. Par contre, un seul implant

de 20 mg avait été administré en région intramusculaire chez le rat (260 – 290 g) alors que les lapins (2 kg) ont reçu jusqu'à six implants de 200 mg au même site. Cette comparaison vient renforcer l'absence de toxicité et l'excellente biocompatibilité du Contramid[®].

3.1.4. Biocompatibilité chez le porc

Enfin, à titre anecdotique, pour étudier la libération *in vivo* d'un peptide à partir d'une matrice de Contramid[®], des implants ont été administrés en région sous-cutanée chez le porc. En ce qui concerne la biocompatibilité du Contramid[®], le suivi chez cette espèce animale n'a été que clinique (systémique) et macroscopique (local), ce dernier aspect ayant été accompli de manière moins assidue que chez la souris. Cependant, d'un point de vue clinique, tous les animaux ont été en bonne santé et aucune complication n'a été enregistrée au cours de cette étude. Les animaux implantés avec du Contramid[®] n'ont présenté aucune réaction inflammatoire au site d'implantation comme de l'œdème, de l'érythème, de la chaleur, de la douleur, de l'écoulement, de l'infection ou encore de la nécrose (Cotran et coll., 1994 ; Tizard, 1996). Ces animaux ne se sont ainsi pas différenciés de ceux implantés uniquement avec le peptide, ni de ceux traités par injection.

3.1.5. Conclusions

En ce qui concerne la biocompatibilité du Contramid[®], ce polysaccharide s'est révélé être un matériau non seulement doté d'une excellente biocompatibilité chez plusieurs espèces mais aussi d'une capacité de dégradation – érosion sans complication. D'autres polysaccharides comme la cellulose (Märtson et coll., 1999), le chitosan (Rao et Sharma, 1997) et le dextran (Draye et coll., 1988), ont été évalués avec une bonne biocompatibilité *in vivo*. Les microparticules d'amidon par voie nasale, ont déjà fait preuve d'une bonne biocompatibilité chez le lapin (Björk et coll., 1991). Ces mêmes particules se sont révélées biodégradables chez l'Homme après injection intra-artérielle (Dakhil et coll., 1982). Ainsi, grâce aux nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* avec le Contramid[®] et les

microparticules d'amidon, une explication de la dégradation – érosion du Contramid[®] peut être avancée. Une dégradation initiale de type hydrolytique n'est pas impossible mais elle doit être minime puisqu'en l'absence d'enzymes, le gel de Contramid[®] s'est révélé très stable *in vitro* avec une faible érosion (Lenaerts et coll., 1998 ; Moussa et Cartilier, 1996 ; Rahmouni et coll., 2001). Par contre il a été rapporté que l'amidon est dégradé *in vivo* par l' α -amylase sérique (Arfors et coll., 1976 ; Dakhil et coll., 1982 ; Forsberg, 1978). Le Contramid[®] est également dégradé *in vitro* par l' α -amylase pour donner du glucose, maltose et maltotriose (Rahmouni et coll., 2001), molécules qui sont aisément métabolisées et éliminées *in vivo*. La dégradation *in vivo* du Contramid[®] débute par l'action d'enzymes à l'interface de l'implant. L' α -amylase peut être présente au site d'implantation mais il est plus probable que la dégradation enzymatique du Contramid[®] se fait d'abord par la phagocytose dite frustrée. Les macrophages, incapables de phagocyter des éléments trop grands, déversent, à l'interface de l'implant, leur contenu lysosomal comprenant des agents acides et des enzymes qui facilitent la dégradation du polymère par scission des chaînes polysaccharidiques. Il a aussi été démontré *in vitro* et *in vivo* que les microparticules d'amidon sont phagocytées par les macrophages et dégradées dans les lysosomes par les α -glucosidases notamment (Artursson et coll., 1984, 1987a, 1988 et 1989 ; Laakso et coll., 1986). Ainsi, quand les fragments polysaccharidiques de Contramid[®] sont suffisamment petits, ils sont phagocytés par les macrophages activés pour être ensuite complètement résorbés dans les vacuoles des phagolysosomes par action enzymatique.

Par ailleurs, quels que soient l'espèce animale et le site d'implantation, l'observation microscopique a toujours montré le développement d'une faible fibrose périphérique et d'une bonne néovascularisation au sein de l'implant Contramid[®] et des tissus adjacents. La réaction à corps étranger de type granulomateux et l'encapsulation biologique par fibrose dense sont des réponses naturelles de l'hôte qui visent à isoler l'implant afin de mieux se protéger face à cette agression. Or, ce genre de réaction est néfaste pour un système à libération contrôlée d'un principe actif et/ou doté d'un

biosenseur. En effet, l'isolement du système par encapsulation empêche toute diffusion possible de molécules entre l'implant et l'hôte, rendant le système complètement inopérant. Par conséquent, la faible fibrose et la néovascularisation autour de l'implant Contramid[®] permettent de suggérer une bonne diffusion des molécules avec les tissus adjacents, donnant ainsi un bon espoir de biofonctionnalité de l'implant Contramid[®] en tant que système à libération contrôlée.

3.2. Propriétés de libération contrôlée des implants Contramid[®]

3.2.1. Implants d'hexénoyl-trans-3-hGRF chez le porc

Les propriétés de libération contrôlée des implants Contramid[®] *in vivo* ont d'abord été observées chez le porc, avec l'étude de cinétique de libération de l'hexénoyl-trans-3-hGRF (Hex-hGRF). Ce peptide est un puissant analogue du facteur de libération de l'hormone de croissance (GRF) qui stimule la production et la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) au niveau hypophysaire (Tannenbaum, 1990). Dans cette étude, il a été démontré qu'un peptide peut être libéré sous sa forme active à partir d'une matrice de Contramid[®] implantée en région sous-cutanée. De manière plus générale, la biofonctionnalité du Contramid[®] sous forme d'implant solide a ainsi été démontrée pour la première fois.

Par rapport à la souris utilisée dans l'étude de biocompatibilité, le porc a été choisi comme modèle animal dans cette étude pour trois raisons précises :

- o Le porc a un format mieux adapté pour administrer une dose de Hex-hGRF qui permet de fabriquer des implants de dimensions raisonnables. En effet, des implants de Hex-hGRF pour les souris auraient été minuscules et la fabrication aurait été trop compliquée, voire moins fiable.

- o La méthode pour effectuer les prises de sang répétées était plus facile chez le porc et les quantités plus appropriées pour doser les concentrations du facteur insulino-mimétique I (IGF-I) en réponse à l'administration de Hex-hGRF.
- o De tels implants de Hex-hGRF ont une application potentielle chez le porc pour des raisons économiques en améliorant la qualité de la carcasse au moment de l'abattage (Dubreuil et coll., 1990 ; Klindt et coll., 1995).

Statistiquement, l'effet temps a été significatif ($p < 0.05$) pour les hausses de concentrations sériques d'IGF-I dans les deux groupes traités avec les implants Contramid[®]. Ainsi, l'efficacité de l'implant Contramid[®] est démontrée parce qu'une action exogène de GRF a stimulé la libération de GH au niveau pituitaire qui a stimulé, à son tour, la production d'IGF-I (Corpas et coll., 1993a), retrouvé à des concentrations plus élevées dans le sang.

L'effet traitement n'a pas été observé entre les deux groupes traités aux implants Contramid[®]. Les profils des deux courbes de concentrations sériques d'IGF-I en fonction du temps, n'étaient pas significativement différents ($p > 0.05$). Ce résultat permet d'affirmer que la matrice Contramid[®] a une bonne robustesse *in vivo* par rapport à la charge du peptide qu'on lui impose. À ce niveau, l'implant Contramid[®] présente un avantage par rapport aux microsphères PLGA qui, contenant un analogue du GRF porcin (pGRF), entraînent une réponse proportionnelle à leur charge en peptide, après injection sous-cutanée chez le porc (Thompson et coll., 1997).

Cette étude a aussi démontré que le Contramid[®] apporte un contrôle significatif de la libération du peptide en évitant le phénomène de libération massive initiale (effet de décharge), tel qu'il a été observé chez les animaux du groupe traité avec des implants purs de Hex-hGRF. L'ajout de Contramid[®] dans l'implant permet d'obtenir un profil de concentrations sériques d'IGF-I non toxiques, caractérisé par un plateau de 5 jours. Par contre, l'activité de Hex-hGRF s'est arrêtée pour tous les groupes traités avec des implants, au bout de 10 jours. Ensuite il n'y avait plus de différence significative entre les deux

groupes Contramid[®] et le groupe implants purs, avec des concentrations d'IGF-I redevenues normales. Tous les groupes implantés ont reçu la même dose de Hex-hGRF (15 mg) mais la biodisponibilité extrapolée à partir de l'aire sous la courbe de la concentration d'IGF-I, est différente entre les groupes traités. Par conséquent, pendant ces 10 jours, la quantité de Hex-hGRF libérée devait être moindre dans les groupes d'implants Contramid[®] que dans le groupe d'implants purs. L'hypothèse la plus probable est une perte d'activité du Hex-hGRF à cause de son instabilité *in vivo*, complication souvent rencontrée avec les peptides (Gombotz et Pettit, 1995). De la même manière, ni la dose administrée de pGRF aux porcs, ni la charge des microsphères PLGA n'ont permis de prolonger la durée d'activité de ce peptide, qui était aussi de 9 à 12 jours (Thompson et coll., 1997).

La sécrétion de GH et la concentration sérique d'IGF-I étant intimement liées aux performances de croissance, de qualité de carcasse et de production de lait (Dubreuil et coll., 1990 ; Klindt et coll., 1995 ; Foster, 1999), un système implantable à libération prolongée de GRF comme l'implant Contramid[®] à faible coût de fabrication, aurait un grand intérêt économique chez les animaux de production. La GH diminue la lipogenèse directement ou par l'intermédiaire de l'IGF-I, et augmente l'accrétion protéique toujours par l'intermédiaire de l'IGF-I, améliorant ainsi la croissance chez les animaux de production (Dubreuil et coll., 1990). L'administration d'implants de GH chez le porc a permis une baisse de la consommation alimentaire en gardant stable le gain pondéral moyen quotidien (Klindt et coll., 1995). Malheureusement, ce genre d'implant ne permet pas une libération rythmique de GH dont la fréquence et l'amplitude des pics sont importantes pour une meilleure efficacité. Un système à libération rythmique de GH, adaptée physiologiquement de manière automatique par l'intermédiaire d'un biosenseur, serait idéal mais sa conception serait fastidieuse et beaucoup trop onéreuse pour une application chez les animaux de production. Par ailleurs, des injections sous-cutanées biquotidiennes (Corpas et coll., 1992) et des perfusions continues (Corpas et coll., 1993b) de GRF pendant deux semaines, ont permis de rétablir les sécrétions de GH et les

concentrations d'IGF-I chez les personnes âgées. De la même manière chez le porc, l'injection à long terme d'un puissant analogue du GRF a permis d'améliorer l'efficacité alimentaire en augmentant le gain pondéral moyen quotidien et en diminuant la prise alimentaire quotidienne (Dubreuil et coll., 1990). De plus, des concentrations élevées continues de GRF pendant deux semaines chez l'Homme (Vance et coll., 1989) et six jours chez le porc (Dubreuil et coll., 1991), n'ont causé ni la désensibilisation, ni l'épuisement des cellules somatotropes de l'hypophyse. Par conséquent, une administration continue de GRF sur une longue période, semble plus judicieuse puisque le cycle physiologique des libérations rythmiques de GH est conservé. Dans ces conditions, les pics de sécrétion de GH ont été augmentés en amplitude chez le porc (Dubreuil et coll., 1991) et en fréquence l'Homme (Corpas et coll., 1993b ; Vance et coll., 1989), provoquant dans les deux cas, une augmentation de la sécrétion de GH et des concentrations sériques d'IGF-I. Ainsi, tout au long de sa période de fonctionnement, un implant à libération prolongée de GRF devrait augmenter les pics de GH pendant les périodes non réfractaires (Dubreuil et coll., 1987).

3.2.2. Implants de ciprofloxacine

3.2.2.1. Caractérisation *in vitro*

3.2.2.1.1. Tests de dissolution de 24 h

Douze formulations d'implants Contramid[®] contenant de la ciprofloxacine (CFX) ont été testées (Tableau I) afin d'en choisir une ou plusieurs pour les tests de dissolution prolongée, en vue d'une utilisation ultérieure en antibiothérapie loco-régionale. Ces implants doivent avoir un effet de décharge minimal avec une faible libération de CFX après 24 heures. Habituellement le HPMC est utilisé dans les préparations à libération contrôlée de principe actif (Ishikawa et coll., 2000 ; Ford et coll., 1985 ; Reynolds et coll., 1998). Pour des formulations destinées à la voie orale, l'ajout de HPMC dans des comprimés matriciels de Contramid[®], a permis de diminuer la vitesse de libération d'acide

acétylsalicylique en milieu *in vitro* contenant de l' α -amylase digestive (Chouinard et Lenaerts, 1997). Le HPMC a ainsi procuré une protection contre la dégradation enzymatique. Cette protection assurée par le HPMC aurait été une caractéristique très intéressante à obtenir avec les implants Contramid[®]. En effet, après implantation, les études d'histocompatibilité ont montré que le Contramid[®] subit une dégradation enzymatique, comme tout amidon (Arfors et coll., 1976 ; Artursson et coll., 1984, 1987a, 1988 et 1989 ; Dakhil et coll., 1982 ; Forsberg, 1978 ; Laakso et coll., 1986).

Cependant, l'ajout de HPMC n'a pas été bénéfique sur le comportement *in vitro* des implants Contramid[®]. De manière significative, le gonflement, l'érosion et la prise d'eau des implants ont augmenté proportionnellement avec le pourcentage de HPMC présent dans la matrice. Parallèlement, la variation de ces trois paramètres était minimale pour les implants de contrôle ou contenant 1 % de Lubritab[®] (HVO), quelle que soit la charge en CFX.

Pour les implants contenant du HPMC, une plus grande érosion a pu provoquer une erreur par défaut de la mesure du gonflement qui devrait être en réalité plus élevé. Il est tout à fait normal de trouver des valeurs de prise d'eau et de gonflement plus élevées pour les matrices avec du HPMC qui est un polymère très hydrophile (Ishikawa et coll., 2000 ; Ford et coll., 1985 ; Reynolds et coll., 1998). Une plus grande imbibition de la matrice polymère dans un milieu ayant une force ionique élevée (0.2) comme le PBS, peut altérer les propriétés de la couche de gel périphérique qui est observée dans les systèmes à libération contrôlée par gonflement (Colombo et coll., 1995 ; Ju et coll., 1995 ; Yang et coll., 1998) comme le Contramid[®] (Lenaerts et coll., 1998 ; Moussa et Cartilier, 1996), et qui est responsable de la cinétique de libération. Avec une plus grande proportion de HPMC, la couche de gel périphérique est plus épaisse et la libération de molécule, plus lente (Ishikawa et coll., 2000). Or, dans cette étude, quand la proportion de HPMC dans l'implant augmente, la vitesse de libération de CFX croît. L'altération du gel périphérique

par le milieu tampon peut être une explication de l'érosion et de la libération de CFX plus rapides des implants contenant du HPMC.

Parmi deux implants ayant une dégradation – érosion enzymatique *in vivo*, celui qui subit aussi une érosion non enzymatique, est plus vulnérable face à la réaction inflammatoire de l'hôte. En se dégradant plus rapidement, un tel implant aura une performance *in vivo* réduite. Le HPMC risque donc de limiter cette performance.

De plus, il a été démontré, sans vraiment d'explication, que la prise d'eau du Contramid[®] diminue quand la concentration de NaCl (force ionique) du milieu tampon augmente (Moussa et coll., 1998b). De la même manière, les comprimés de Contramid[®] immergés dans du PBS, gonflent moins tout en mettant plus de temps à atteindre leur équilibre de gonflement par rapport à ceux immergés dans de l'eau distillée (Ravenelle et coll., 2002). Parmi les différentes formulations, les implants de contrôle et 1%-HVO ont une plus petite prise d'eau que les implants avec HPMC, aussi parce qu'ils contiennent plus de Contramid[®]. Alors la solubilisation et la diffusion du principe actif dans la matrice sont plus lentes, ce qui se traduit par une vitesse de libération de CFX plus faible avec les implants de contrôle et 1%-HVO.

Un plus fort gonflement de l'implant avec le HPMC peut aussi modifier la réponse de l'hôte et la cinétique de libération. Une pression accrue des tissus avoisinants risque de provoquer une rupture de l'hydrogel avec une perte totale du contrôle de la libération (Langer, 1990 ; Park et Park, 1996). De plus, la réaction cellulaire de l'hôte peut se trouver modifiée par l'aspect très hydrophile d'un polymère comme le HPMC (Hunt et coll., 1997).

La charge en CFX a eu un effet significatif sur la prise d'eau des implants, surtout sur ceux qui contenaient du HPMC. La prise d'eau diminuait quand la charge en CFX augmentait. Une plus grande charge de CFX fait diminuer la proportion de polymère hydrophile donc le pouvoir de prise d'eau de l'implant. L'effet était d'autant plus marqué avec le HPMC parce que ce dernier est d'autant plus hydrophile.

D'après les tests de dissolution 24 heures, le Contramid[®] semble être un polymère avec un bon potentiel pour concevoir des implants contenant de la CFX afin de les utiliser en antibiothérapie loco-régionale. Le HPMC a été écarté pour la suite du développement de ces implants. Les implants 1%-HVO ont eu un comportement similaire aux implants de contrôle sans HVO. Par conséquent, ces implants ont été sélectionnés pour les tests de dissolution prolongés (Tableau I).

Tableau I : Description des implants de ciprofloxacine testés *in vitro* et *in vivo*.

Matrice	CFX	Nomenclature	Tests
Contramid [®]	2.5 %	2.5%-CFX/Contrôle	Dissolution 24 heures / Gonflement / Érosion / Prise d'eau
	5.0 %	5.0%-CFX/Contrôle	
	7.5 %	7.5%-CFX/Contrôle	
Contramid [®] 10 % HPMC	2.5 %	2.5%-CFX/10%-HPMC	Dissolution 24 heures / Gonflement / Érosion / Prise d'eau
	5.0 %	5.0%-CFX/10%-HPMC	
	7.5 %	7.5%-CFX/10%-HPMC	
Contramid [®] 20 % HPMC	2.5 %	2.5%-CFX/20%-HPMC	Dissolution 24 heures / Gonflement / Érosion / Prise d'eau
	5.0 %	5.0%-CFX/20%-HPMC	
	7.5 %	7.5%-CFX/20%-HPMC	
Contramid [®] 1 % HVO	2.5 %	2.5%-CFX/1%-HVO	Dissolution 24 heures / Gonflement / Érosion / Prise d'eau / Dissolution 21 jours
	5.0 %	5.0%-CFX/1%-HVO	
	7.5 %	7.5%-CFX/1%-HVO	
Contramid [®] 0.5 % HVO	2.5 %	2.5%-CFX/0.5%-HVO	Implantation
	7.5 %	7.5%-CFX/0.5%-HVO	
	15.0 %	15.0%-CFX/0.5%-HVO	
	20.0 %	20.0%-CFX/0.5%-HVO	

3.2.2.1.2. Tests de dissolution prolongée

Dans cette étude, il a été démontré que les implants Contramid[®] peuvent libérer la CFX sur au moins 21 jours, de manière fiable et reproductible. Comme dans les dissolutions de 24 heures, le pourcentage relatif de CFX libéré diminuait quand la charge augmentait, pour un temps donné. Au bout de 21 jours, les implants 7.5%-CFX avait libéré environ 10 % en moins de leur charge initiale que les implants 2.5%-CFX. Ainsi, à la fin du test de dissolution, il restait approximativement 2 mg de CFX dans les implants chargés initialement à 7.5 % alors que les implants 2.5%-CFX étaient pratiquement vides. Cette caractéristique est très intéressante puisque la durée de libération d'un implant Contramid[®] peut être prolongée en augmentant la quantité de CFX incorporée au départ.

Cette différence de vitesse relative de libération en fonction de la charge initiale de l'implant, se manifeste essentiellement au cours des premières 48 heures. Ensuite, les vitesses de libération des trois charges de CFX, sont identiques. En fait, cela signifie que l'effet de décharge est moindre avec une charge de CFX plus élevée. Cette tendance est un atout pour les implants Contramid[®]. En effet, l'augmentation de la charge initiale de l'implant en CFX pour prolonger la durée de libération, n'impliquera pas un plus grand risque d'effet de décharge que l'on cherche à éviter dans un système à libération contrôlée (Langer, 1990). Par conséquent, dans le cas des implants Contramid[®], une charge élevée en CFX sera plus appropriée pour une utilisation dans le cadre de l'antibiothérapie loco-régionale, avec une libération prolongée et un effet de décharge limité.

Trois hypothèses peuvent expliquer la cinétique de libération différente en fonction de la charge des implants Contramid[®], observée dans les premières 48 heures :

- o Il a déjà été rapporté avec l'éthylcellulose que la cinétique de libération d'une même molécule peut varier en fonction de la charge de la matrice (Neau et coll., 1999). Il semble que le mécanisme de libération change en fonction de la charge de principe actif. On peut émettre l'hypothèse qu'un phénomène similaire se produit avec une matrice de Contramid[®], pour expliquer les

différences de vitesse de libération relative de CFX entre les trois charges testées dans cette étude.

- o Il existe des interactions potentielles entre le polymère et la molécule active, qui peuvent affecter la diffusion de cette dernière à travers la matrice du premier. Ces interactions correspondent à la somme des forces d'attraction et de répulsion, dont le résultat varie en fonction de la proportion de molécules actives incorporées au sein du réseau polymère. Ce phénomène a été récemment mis en évidence avec un dérivé du Contramid[®] carboxylé (Mulhbachter et coll., 2001). La libération d'acide acétylsalicylique était plus lente quand la charge initiale était plus élevée. Cette tendance a été attribuée aux interactions physiques entre les groupements carboxyliques de la molécule active et ceux du polymère. De manière similaire, il est possible que la forme hydrochloride de la CFX ait interagi avec le Contramid[®] d'une certaine façon.
- o Les propriétés physico-chimiques du principe actif doivent être prises en considération, surtout quand on augmente la charge de l'implant. En fonction de la solubilité et du caractère hydrophile de la molécule à libérer, la diffusion de l'eau à l'intérieur de la matrice peut être ralentie et par conséquent la libération altérée. Ceci est d'autant plus critique pour un polymère hydrogel dont le mécanisme de libération dépend de la vitesse d'entrée d'eau. Avec les tests de dissolution de 24 heures qui correspondent à la période de différence de cinétique entre les formulations, il a été montré que la prise d'eau diminuait inversement proportionnelle à la charge de CFX. Ce phénomène est causé par un certain caractère hydrophobe de la CFX qui est une molécule modérément soluble. Par conséquent, avec une quantité initiale accrue de CFX dans l'implant, le milieu tampon pénètre moins vite la matrice et relativement moins de CFX se solubilise et diffuse à l'extérieur.

Tout comme la différence de libération en fonction de la charge se manifeste dans les premières 48 heures, il a été observé que par la suite, les cinétiques de libération du pourcentage de CFX sont identiques, quelle que soit la charge initiale de l'implant Contramid[®]. Cette stabilisation de la libération de CFX peut s'expliquer par la formation de la couche de gel périphérique observée avec les matrices dont le mécanisme de libération est contrôlé par le gonflement (Colombo et coll., 1995 ; Ju et coll., 1995 ; Yang et coll., 1998) comme c'est le cas pour le Contramid[®] (Le Bail et coll., 1999 ; Lenaerts et coll., 1998 ; Moussa et Cartilier, 1996). Pour ces matrices à gonflement, l'épaisseur de la couche

de gel est un facteur important dans le contrôle de la libération d'une molécule. La couche de gel est délimitée par un front d'érosion à l'interface avec le milieu extérieur, un front de gonflement avec le noyau intérieur et un front intermédiaire de dissolution (Colombo et coll., 1995 ; Ferrero et coll., 2000). Habituellement, au cours de la libération du principe actif, l'épaisseur du gel périphérique commence par augmenter avec le gonflement du polymère, pour ensuite se stabiliser et enfin régresser avec l'érosion (Colombo et coll., 1995 ; Yang et coll., 1998). En fait, la phase de stabilisation de l'épaisseur du gel correspond à une synchronisation transitoire de l'évolution des différents fronts. Par contre, il a été montré avec le Contramid[®], que la couche de gel périphérique se forme rapidement après immersion dans un milieu tampon (Moussa et coll., 1998a), et que son épaisseur reste constante dans le temps avec une érosion minimale (Lenaerts et coll., 1998). De la même manière, les implants Contramid[®] se sont montrés stables dans le temps. Après 21 jours dans le PBS, les implants avaient le même aspect macroscopique que ceux immergés pendant 24 heures. Après section transversale, ces implants présentaient encore une couche de gel périphérique distincte. La formation rapide du gel périphérique et son maintien dans le temps peuvent expliquer respectivement le contrôle initial de l'effet de décharge et la libération subséquente du pourcentage de CFX, similaire pour les trois charges testées.

Avec une corrélation *in vivo*, les implants Contramid[®] devraient être supérieurs aux PLA et PLGA en antibiothérapie loco-régionale, pour deux raisons :

- o Les concentrations de CFX obtenues *in vitro* avec les PLA, sont très faibles pendant les dix premiers jours (Andreopoulos et coll., 1996 ; Kanellakopoulou et coll., 1999). Or, pendant cette période, il est nécessaire d'atteindre des concentrations locales tissulaires très élevées en antibiotique, afin de maîtriser la population bactérienne dès le début de sa colonisation. Les implants Contramid[®] débutent avec une libération de CFX qui devrait prévenir la colonisation initiale, tout en conservant une innocuité systémique.
- o À partir d'implants PLGA, le profil de libération de CFX *in vitro* est biphasique (Ramchandani et coll., 1998). Les deux phases sont séparées par un plateau où la vitesse de libération devient suffisamment faible pour permettre le développement éventuel d'une résistance bactérienne. Par contre,

la CFX est libérée de manière permanente avec les implants Contramid[®], ne laissant aucun répit aux bactéries en place. Cette différence de profil entre Contramid[®] et PLGA, provient du mécanisme de libération propre à chaque polymère. La libération contrôlée avec le Contramid[®], est gérée par un mécanisme de gonflement de matrice puis de diffusion du principe actif (Lenaerts et coll., 1991 et 1998) alors que les polyesters contrôlent la libération par leur dégradation de masse.

3.2.2.2. Caractérisation *in vivo* : implantation chez le lapin

3.2.2.2.1. Avant-propos

In vitro, les implants 1%-HVO ont eu un comportement similaire aux implants de contrôle sans HVO. Lors des tests de dissolution de 24 heures, les courbes de libération de CFX étaient identiques entre les implants 0.5%-HVO et les implants 1%-HVO avec une même charge de CFX. Par conséquent, toute proportion de HVO comprise entre 0 et 1 %, ne devrait pas changer les propriétés de l'implant Contramid[®]. Ainsi, pour des raisons pratiques de fabrication, le HVO a été inséré à 0.5 % dans les implants Contramid[®] pour l'étude de caractérisation *in vivo*.

La force de compression utilisée pour fabriquer les implants Contramid[®] n'était pas un facteur critique par rapport à leur dégradation – érosion, leur vitesse de libération et leur charge en CFX. Tous ces implants qui avaient la même dureté, ont été fabriqués avec la même force de compression (17 kN). Or, il a été démontré *in vitro* qu'avec des comprimés matriciels de Contramid[®], la dureté, l'érosion enzymatique par l' α -amylase et la vitesse de libération d'un principe actif ne sont aucunement affectées par la force de compression tant que cette dernière reste supérieure à 6 kN (Rahmouni et coll., 2001). Cette condition était donc satisfaite avec les implants Contramid[®]. De plus, la porosité et le diamètre moyen des pores d'une matrice compactée de Contramid[®] diminuent quand la force de compression augmente (Moussa et coll., 1998b). Ainsi, une force de compression suffisamment élevée

comme celle utilisée pour fabriquer les implants, ne permet pas une grande surface d'exposition du Contramid® aux macrophages pour la biodégradation enzymatique. En plus du mécanisme de gonflement – diffusion démontré *in vitro* (Lenaerts et coll., 1991 et 1998 ; Moussa et coll., 1996), un phénomène de dégradation – érosion du Contramid® vient s'ajouter *in vivo* dans la vitesse de la libération du principe actif.

3.2.2.2.2. Concentrations systémiques

L'implantation des systèmes à libération contrôlée pour un traitement spécifique loco-régional est parfois appliquée dans le but d'éviter une toxicité systémique du principe actif (Langer, 1990). Dans ce cas, l'avantage d'un tel système est de conserver des concentrations systémiques suffisamment basses qui assurent une certaine sécurité à l'hôte avec l'utilisation d'un principe actif potentiellement toxique. Bien que la CFX ne soit pas une molécule hautement toxique, il a été démontré dans cette étude que l'implant Contramid® permet d'assurer cette sécurité. En effet, même le plus haut pic sérique atteint avec les implants 2.5%-CFX au premier jour, est en dessous de la concentration minimale inhibitrice (MIC) de CFX pour *S. aureus*, donc bien en dessous du niveau de toxicité.

Par rapport aux implants 2.5%-CFX, l'effet de décharge a été mieux contrôlé avec les implants 7.5%-CFX qui ont aussi donné un profil sérique de CFX plus reproductible. Ces résultats rejoignent ceux obtenus avec les tests de dissolution *in vitro* où le contrôle de la libération s'améliorait avec une charge croissante de CFX. Cette tendance s'est confirmée *in vivo* pour des charges en CFX encore plus élevées avec les implants 15.0%-CFX et 20.0%-CFX. Il faut cependant considérer le facteur de l'interface implant – hôte entre les groupes, dans l'étude présente. L'interface était plus réduite avec un seul implant (groupes 15.0-CFX et 20.0-CFX) qu'avec deux (groupe 7.5%-CFX) et six (groupe 2.5%-CFX) implants. La plus grande interface causée par les six implants a probablement fait accroître les vitesses de solubilisation – diffusion de CFX et de dégradation – érosion du Contramid®, augmentant ainsi la vitesse de libération de CFX pour le groupe 2.5%-CFX.

En plus de l'intérêt de mieux limiter l'effet de décharge, le fait d'augmenter la charge de l'implant a permis d'obtenir une libération de CFX plus stable dans le temps qui s'est reflétée par un profil des concentrations sériques de CFX, en forme de plateau.

3.2.2.2.3. Concentrations tissulaires locales

En ce qui concerne le tissu musculaire, les implants 2.5%-CFX et 7.5%-CFX ont libéré la CFX pendant 21 jours. Malgré la réaction inflammatoire de l'hôte et la dégradation – érosion du Contramid[®], cette durée de libération est identique à celle obtenue *in vitro*. Entre le test de dissolution prolongée et le modèle d'implantation chez le lapin, on obtient une bonne corrélation *in vitro* – *in vivo* pour les implants Contramid[®]. Cette corrélation est intéressante à considérer pour le développement ultérieur de nouvelles formulations avec les implants Contramid[®]. De surcroît, la durée de libération et la quantité libérée de CFX dans le muscle sont plus élevées quand la charge de l'implant Contramid[®] augmente. Cette tendance avait aussi été observée avec les trois charges de CFX testées *in vitro* (2.5 %, 5.0 % et 7.5 %). Par contre, *in vivo*, entre les implants 2.5%-CFX et 7.5%-CFX, seules les quantités libérées sont différentes parce que la durée de libération est de 21 jours pour les deux formulations. Il faut considérer les charges plus élevées pour observer une augmentation de la durée de libération de CFX. En effet, les implants 15.0%-CFX et surtout 20.0%-CFX ont permis d'obtenir des concentrations de CFX dans le muscle, supérieures à la MIC pendant au moins 28 jours. Ainsi, avec de faibles concentrations systémiques de CFX et une longue libération locale à des concentrations élevées, les implants 20.0%-CFX deviennent très intéressants pour l'utilisation en antibiothérapie loco-régionale. Ces résultats positifs justifient l'intérêt d'études ultérieures sur l'efficacité des implants Contramid[®] 20.0%-CFX chez un modèle animal d'infection.

Pour une formulation donnée et un temps de prélèvement donné, les concentrations osseuses de CFX ont toujours été plus faibles que celles obtenues dans le muscle. Toujours est-il que les concentrations de CFX dans l'os ont suivi les mêmes tendances d'évolution

que les concentrations musculaires quand la charge de l'implant augmentait. Les concentrations osseuses étaient inférieures à la MIC aux jours 14, 21 et 28 pour les implants 2.5%-CFX et 7.5%-CFX. Il faut signaler que, lors de l'implantation, le périoste n'a pas été incisé et le tissu osseux n'a été exposé directement d'aucune manière (forage). Cet aspect a très certainement limité la diffusion de CFX dans l'os. Les concentrations osseuses observées dans cette étude correspondent principalement à la distribution locale de CFX des implants Contramid[®] via la perfusion du fémur assurée par la vascularisation locale du membre. À l'inverse, dans une situation de fracture infectée, la pénétration osseuse de CFX serait par diffusion directe à partir des implants adjacents. Par conséquent, avec des implants Contramid[®] dans les situations cliniques, on peut s'attendre à des concentrations osseuses de CFX plus élevées que celles observées dans cette étude. En suivant cette démarche, les résultats obtenus avec les implants 15.0%-CFX et 20.0%-CFX deviennent encore plus encourageants parce que les concentrations osseuses de CFX sont supérieures à la MIC pendant au moins 28 jours, malgré les barrières du périoste et de l'os cortical intacts.

Pour tous les groupes de cette étude, les concentrations osseuses de CFX au jour 14 étaient plus faibles que celles rapportées dans une étude avec des implants de microsphères PLGA (0.45 cm x 0.51 cm) de 100mg de CFX (Rachamdani et Robinson, 1998). Cette différence est due à l'administration d'une dose CFX par animal supérieure d'une part (100 mg versus 30 – 40 mg) et à la mise en place des implants PLGA directement dans l'os d'autre part. Par contre, les concentrations osseuses sont beaucoup plus reproductibles avec les implants Contramid[®].

Aux jours 3 et 7, les concentrations musculaires et osseuses de CFX n'ont pas été mesurées dans les groupes 15.0%-CFX et 20.0%-CFX. On a vu que les concentrations sériques de ces deux groupes étaient identiques à celles des autres groupes au jour 3 et significativement plus élevées au jour 7. Par déduction, on peut assumer que les concentrations locales de CFX dans les groupes 15.0%-CFX et 20.0%-CFX sont

supérieures à la MIC aux jours 3 et 7, comme c'est le cas pour les autres groupes. L'objectif principal de l'étude n'a pas été affecté puisqu'il consistait à évaluer la durée de libération de CFX en fonction des charges. Par la même occasion, moins d'animaux ont été utilisés, en accord avec le Comité Canadien de Protection des Animaux (Olfert et coll., 1993).

3.2.2.2.4. *Ciprofloxaciné résiduelle dans les implants*

Le pourcentage de CFX dans les implants après récupération, a diminué à la même vitesse dans les groupes 15.0%-CFX et 20.0%-CFX. Ces résultats *in vivo* sont corrélés avec les observations *in vitro* où après les premières 48 heures, les cinétiques de libération du pourcentage de CFX sont identiques, quelle que soit la charge initiale de l'implant Contramid[®]. Par ailleurs, les variations de CFX résiduelle avec les différentes charges dans les implants, sont aussi corrélées avec l'augmentation de la durée et de la quantité de libération de CFX tissulaire locale lors de l'augmentation de la charge. De plus, avec 6 % de CFX résiduelle au jour 28 dans les groupes 15.0%-CFX et 20.0%-CFX, on peut affirmer que les implants Contramid[®] sont effectifs pendant plus de 4 semaines. Ces implants deviennent ainsi une solution potentielle pour prévenir et/ou traiter l'ostéomyélite. En effet, le traitement nécessite un débridement des tissus impliqués incluant un curetage de l'os infecté, avec une médication antibactérienne de 4 à 6 semaines (Rissing, 1997).

3.2.2.2.5. *Conclusion*

Les quinolones ont déjà apporté d'excellents résultats dans le traitement de l'ostéomyélite expérimentale avec ou sans la présence d'un corps étranger (Lew et Waldvogel, 1999). Chez l'Homme, l'utilisation prolongée d'une fluoroquinolone par voie orale, associée ou pas à un autre agent antibactérien, est une conduite thérapeutique fréquente pour le traitement de l'ostéomyélite (Desplaces et Ascar, 1988 ; Mader et coll., 1990 ; Greenberg et coll., 1987a et 1987b ; Rissing, 1997). Néanmoins, jamais une quinolone administrée seule per os n'a permis une protection optimale contre une infection

osseuse à staphylocoques (Rissing, 1997). Par contre, les implants imprégnés de quinolones se sont montrés efficaces avec l'obtention de hautes concentrations thérapeutiques locales chez les modèles animaux (Lew et Waldvogel, 1999). Les implants Contramid[®] contenant de la CFX devraient remplir les conditions nécessaires pour le traitement antimicrobien loco-régional. En effet, les implants 20.0%-CFX notamment, ont permis d'obtenir des concentrations locales de CFX élevées, sur une longue période, avec un bon contrôle de l'effet de décharge et une faible distribution systémique. Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse que le concept de l'implant Contramid[®] pourrait avoir une efficacité dans le traitement local des infections des tissus mous et de l'os.

Conclusion

Même si les implants à libération contrôlée sont développés depuis le siècle précédent, ils en sont encore à leurs balbutiements au point de vue commercial. Peu de produits utilisant cette technologie, existent actuellement sur le marché pour une utilisation clinique. Mais dernièrement, il y a eu un regain d'intérêt en recherche dans ce domaine et il faut s'attendre dans un avenir proche, à une arrivée sur le marché, d'une vague de nouveaux systèmes implantables pour la libération d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires et d'anticancéreux.

Effectivement, au cours des trois dernières décennies, le développement des biomatériaux est devenu un des domaines de recherche les plus effervescents, impliquant une interrelation de haut niveau entre plusieurs disciplines scientifiques telles que l'ingénierie, la biologie, la chimie, la pharmacologie et la médecine. De nos jours, l'exploration au niveau moléculaire, des interactions entre le tissu vivant de l'hôte et le matériau artificiel de l'implant, représente un des principaux défis dans le développement des biomatériaux. Une meilleure compréhension des événements à l'interface implant – hôte va permettre le développement d'implants caractérisés par une meilleure biocompatibilité à long terme et une performance *in vivo* accrue par la même occasion. En effet, la recherche dans ce domaine tend vers la sophistication des implants pour répondre à des applications biomédicales très spécifiques qui nécessitent des schémas thérapeutiques de plus en plus élaborés.

Le développement de l'implant Contramid[®] reflète cette tendance dans la recherche de nouvelles technologies pour libérer un principe actif adéquatement. Ainsi, au cours des différentes expériences, il a été démontré que :

- o le Contramid[®] est un matériau caractérisé par une tolérance et biocompatibilité excellentes après implantation sous-cutanée et/ou intramusculaire chez différentes espèces animales. La réaction inflammatoire est toujours restée localisée aux sites d'implantation et de faible amplitude, caractérisée par un développement minime de tissu conjonctif périphérique et une bonne néovascularisation péri et intra-implant. Ces caractéristiques sont

favorables à une bonne diffusion de molécules entre l'implant et l'hôte dans le cadre d'une utilisation en libération contrôlée de principe actif.

- o Le Contramid[®] a le grand avantage d'être un matériau résorbable, évitant ainsi la nécessité d'une seconde intervention chirurgicale pour son retrait. Le polymère subit d'abord une dégradation extracellulaire de type hydrolytique et/ou enzymatique pour être fragmenté. Quand les fragments polysaccharidiques de Contramid[®] sont de taille suffisamment réduite, ils sont phagocytés par les macrophages puis complètement résorbés dans les vacuoles des phagolysosomes par voie enzymatique.
- o L'implant Contramid[®] est capable de libérer *in vivo* un peptide tel que le Hex-hGRF, sous sa forme active. Également, le polymère a la capacité de contrôler la diffusion de ce peptide en limitant l'effet de décharge initiale.
- o Le Contramid[®] est un matériau aux propriétés physiques (érosion, gonflement, prise d'eau) adéquates pour l'utiliser sous forme d'implant à libération contrôlée. Ce polymère a la capacité de libérer *in vitro* la ciprofloxacine pendant plusieurs jours, de manière hautement reproductible et en limitant l'effet de décharge initiale.
- o L'implant Contramid[®] est capable de libérer *in vivo* la ciprofloxacine à des concentrations locales élevées tout en conservant des concentrations systémiques très faibles, ce qui permet d'allier efficacité locale et innocuité systémique. Chargé avec 20 % de ciprofloxacine notamment, l'implant Contramid[®] permet d'obtenir des concentrations locales élevées, sur une longue période, avec un bon contrôle de l'effet de décharge et une faible distribution systémique. Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse de l'éventuelle efficacité de l'implant Contramid[®] dans le traitement local des infections des tissus mous et de l'os.

En conclusion, l'observance thérapeutique avec le patient reste un des problèmes majeurs, quel que soit le traitement. De nombreuses thérapies ont échoué, pas à cause de la nature du principe actif mais à cause de son administration inadaptée. Les implants à libération contrôlée vont augmenter de façon significative cette observance thérapeutique avec les molécules déjà existantes.

Bibliographie

- Abraham G.A., De Queiroz A.A.A., et San Roman J.** (2002). Immobilization of a nonsteroidal antiinflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. *Biomaterials* 23: 1625-1638.
- Adams K., Couch L., Cierny G., Calhoun J., et Mader J.T.** (1992). In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 278: 244-252.
- Ailhaud G.** (1982). Adipose cell differentiation in culture. *Molecular and Cellular Biochemistry* 49: 17-31.
- Ailhaud G.** (1997). Hormones et développement adipocytaire. *Annals of Endocrinology* 58: 129-131.
- Ali S.A.M., Doherty P.J., et Williams D.F.** (1993b). Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. 2. Poly(DL-lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research* 27: 1409-1418.
- Ali S.A.M., Zhong S.P., Doherty P.J., et Williams D.F.** (1993a). Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. I. Poly(caprolactone). *Biomaterials* 14: 648-656.
- Ambrosio A.M.A., Allcock H.R., Katti D.S., et Laurencin C.T.** (2002). Degradable polyphosphazene poly(alpha-hydroxyester) blends: degradation studies. *Biomaterials* 23: 1667-1672.
- An Y.H. et Friedman R.J.** (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 43: 338-348.
- Anderson J.M. et Miller K.M.** (1984). Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 5: 5-10.
- Anderson J.M.** (1994a). Inflammation and the foreign body response. *Problems in General Surgery* 11: 147-160.
- Anderson J.M.** (1994b). In vivo biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 40: 1-8.

- Anderson J.M. et Shive M.S.** (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 5-24.
- Anderson J.M. et Langone J.J.** (1999). Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. *Journal of Controlled Release* 57: 107-113.
- Andreopoulos A.G., Korakis T., Dounis E., Anastasiadis A., Tzivelekis P., et Kanellakopoulou K.** (1996). In vitro release of new quinolones from biodegradable systems: a comparative study. *Journal of Biomaterials Applications* 10: 338-347.
- Arfors K.E., Forsberg J.O., Larsson B., Lewis D.H., Rosengren B., et Ödman S.** (1976). Temporary intestinal hypoxia induced by degradable microspheres. *Nature* 262: 500-501.
- Artursson P., Edman P., Laakso T., et Sjöholm I.** (1984). Characterization of polyacryl starch microparticles as carriers for proteins and drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73: 1507-1513.
- Artursson P., Edman P., et Sjöholm I.** (1984). Biodegradable microspheres. I. Duration of action of dextranase entrapped in polyacrylstarch microparticles in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 231: 705-712.
- Artursson P., Martensson I.-L., et Sjöholm I.** (1986). Biodegradable microspheres III: Some immunological properties of polyacryl starch microparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75: 697-701.
- Artursson P., Arro E., Edman P., Ericsson J.L.E., et Sjöholm I.** (1987a). Biodegradable microspheres V: Stimulation of macrophages with microparticles made of various polysaccharides. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 76: 127-133.
- Artursson P., Edman P., et Ericsson J.L.E.** (1987b). Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. *Scandinavian Journal of Immunology* 25: 245-254.

- Artursson P., Johansson D., et Sjöholm I.** (1988). Receptor-mediated uptake of starch and mannan microparticles by macrophages: relative contribution of receptors for complement, immunoglobulins and carbohydrates. *Biomaterials* 9: 241-246.
- Artursson P., Berg A., et Edman P.** (1989). Biochemical and cellular effects of degraded starch microspheres on macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* 52: 183-190.
- Baille W.E., Malveau C., et Marchessault R.H.** (2002). NMR imaging of high-amylose starch tablets. 1. Swelling and water uptake. *Biomacromolecules* 3: 214-218.
- Bakker D., Van Blitterswijk C.A., Hesselink S.C., et Grote J.J.** (1988). Effect of implantation site on phagocyte/polymer interaction and fibrous capsule formation. *Biomaterials* 9: 14-23.
- Bernatchez S.F., Merkli A., Tabatabay C., et Gurny R.** (1993). Biotolerance of semisolid hydrophobic biodegradable poly(ortho ester) for controlled drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research* 27: 677-681.
- Beumer G.J., Van Blitterswijk C.A., et Ponec M.** (1994). Degradative behaviour of polymeric matrices in (sub)dermal and muscle tissue of the rat: a quantitative study. *Biomaterials* 15: 551-559.
- Bélanger M.-C. et Marois Y.** (2001). Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review. *Journal of Biomedical Materials Research* 58: 467-477.
- Björk E. et Edman P.** (1988). Degradable starch microspheres as a nasal delivery system for insulin. *International Journal of Pharmaceutics* 47: 233-238.
- Björk E. et Edman P.** (1990). Characterization of degradable starch microspheres as nasal delivery system for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 62: 187-192.
- Björk E., Bjurström S., et Edman P.** (1991). Morphologic examination of rabbit nasal mucosa after administration of degradable starch microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 75: 73-80.

- Björk E., Isaksson U., Edman P., et Artursson P.** (1995). Starch microspheres induce pulsatile delivery of drugs and peptides across the epithelial barrier by reversible separation of the tight junctions. *Journal of Drug Targeting* 2: 501-507.
- Blaha J.D., Calhoun J., Nelson C.L., Henry S.L., Seligson D., Esterhai J.L., Heppenstall R.B., Mader J.T., Evans R.P., et Wilkins J.** (1993). Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 295: 8-12.
- Bosetti M., Ottani V., Kozel D., Raspanti M., De Pasquale V., Ruggeri A., et Cannas M.** (1999). Structural and functional macrophages alterations by ceramics of different composition. *Biomaterials* 20: 363-370.
- Brocchini S., James K., Tangpasuthadol V., et Kohn J.** (1998). Structure-property correlations in a combinatorial library of degradable biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* 42: 66-75.
- Brown A. et Bennett D.** (1988). Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads for the treatment of septic arthritis. *Veterinary Record* 123: 625-626.
- Bruck S.D.** (1990). Materials or biomaterials ? *The International Journal of Artificial Organs* 13: 469-471.
- Brunette D.M.** (1986). Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Experimental Cell Research* 164: 11-26.
- Buchholz H.W. et Engelbrecht H.** (1970). Depot effect of various antibiotics mixed with placebo resins. *Der Chirurg* : 511-515.
- Buléon A., Colonna P., et Leloup V.** (1990). Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Actualités des Industries Alimentaires et Agro-alimentaires* : 515-532.
- Butterwith S.C.** (1997). Regulators of adipocyte precursor cells. *Poultry Sciences* 76: 118-123.

- Calhoun J. et Mader J.T.** (1989). Antibiotic beads in the management of surgical infections. *The American Journal of Surgery* 157: 443-449.
- Calhoun J. et Mader J.T.** (1997). Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clinical Orthopaedics and Related Research* : 206-214.
- Callens C. et Remon J.P.** (2000). Evaluation of starch-maltodextrin-Carbopol 974P mixtures for the nasal delivery of insulin in rabbits. *Journal of Controlled Release* 66: 215-220.
- Callens C., Adriaens E., Dierckens K., et Remon J.P.** (2001). Toxicological evaluation of a bioadhesive nasal powder containing a starch and Carbopol 974 P on rabbit nasal mucosa and slug mucosa. *Journal of Controlled Release* 76: 81-91.
- Catelas I., Huk O.L., Petit A., Zukor D.J., Marchand R., et L'Hocine Y.** (1998). Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition. *Journal of Biomedical Materials Research* 41: 600-607.
- Chandra R. et Rustgi R.** (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* 23: 1273-1335.
- Chebli C., Moussa I., Buczkowski S., et Cartilier L.** (1999). Substitued amylose as a matrix for sustained drug release. *Pharmaceutical Research* 16: 1436-1440.
- Chouinard F. et Lenaerts V.** (1997). Protective effect of HPMC on cross-linked amylose controlled release tablets. *Proceeding of International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials* 24: 265-266.
- Cierny G. et Mader J.T.** (1987). Approach to adult osteomyelitis. *Orthopaedic Review* 16: 259-270.
- Classen D.A.** (1996). Antibiotic bead pouch dressing. *Canadian Journal of Plastic Surgery* 4: 199-202.
- Coleman D.L., King R.N., et Andrade J.D.** (1974). The Foreign Body Reaction: A Chronic Inflammatory Response. *Journal of Biomedical Materials Research* 8: 199-211.

- Colombo P., Bettini R., Massimo G., Catellani P.L., Santi P., et Peppas N.A.** (1995). Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84: 991-997.
- Corpas E., Harman S.M., Piñeyro M.A., Roberson R., et Blackman M.R.** (1992). Growth hormone (GH)-releasing hormone-(1-29) twice daily reverses the decrease GH and insulin-like growth factor-L levels in old men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75: 530-535.
- Corpas E., Harman S.M., et Blackman M.R.** (1993). Human growth hormone and human aging. *Endocrinology Review* 14: 20-39.
- Corpas E., Harman S.M., Piñeyro M.A., Roberson R., et Blackman M.R.** (1993). Continuous subcutaneous infusions of growth hormone (GH) releasing hormone 1-44 for 14 days increases GH and insulin-like growth factor-I levels in old men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76: 134-138.
- Cotran R.S., Kumar V., et Robbins S.L.** (1994). Inflammation and Repair. Dans *Pathologic Basis of Disease* (Schoen F.J., Eds). 5ème édition: W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 51-92.
- Curtis A. et Wilkinson C.** (1997). Topographical control of cells. *Biomaterials* 18: 1573-1583.
- Curtis A.S.G. et Clark P.** (1990). The effects of topographic and mechanical properties of materials on cell behavior. *Critical Reviews in Biocompatibility* 5: 343-362.
- D'Emanuele A., Hill J., Tamada J.A., Domb A.J., et Langer R.** (1992). Molecular weight changes in polymer erosion. *Pharmaceutical Research* 9: 1279-1283.
- Dakhil S., Ensminger W., Cho K., Niederhuber J., Doan K., et Wheeler R.** (1982). Improved regional selectivity of hepatic arterial BCNU with degradable microspheres. *Cancer* 50: 631-635.
- Danckwerts M. et Fassih A.** (1991). Implantable controlled release drug delivery systems: a review. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 17: 1465-1502.

- Dash A.K. et Cudworth II G.C.** (1998). Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 40: 1-12.
- Den Braber E.T., De Ruijter J.E., et Jansen J.A.** (1997). The effect of a subcutaneous silicone rubber implant with shallow surface microgrooves on the surrounding tissues in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* 37: 539-547.
- Den Dunnen W.F.A., Robinson P.H., Van Wessel R., Pennings A.J., Van Leeuwen M.B.M., et Schakenraad J.M.** (1997). Long-term evaluation of degradation and foreign-body reaction of subcutaneously implanted poly(DL-lactide-E-caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research* 36: 337-346.
- Dernell W.S.** (1999). Treatment to severe orthopedic infections. *Fracture Management and Bone Healing* 29: 1261-1274.
- Desplaces N. et Ascar J.F.** (1988). New quinolones in the treatment of joint and bone infections. *Review of Infectious Diseases* 10 Suppl.1: S179-S183.
- Dittgen M., Durrani M., et Lehmann K.** (1997). Acrylic polymers. A review of pharmaceutical applications. *S.T.P. Pharma Sciences* 7: 403-437.
- Draye J.P., Delaey B., Van de Voorde A., Van Den Bulcke A., De Reu B., et Schacht E.** (1998). In vitro and in vivo biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. *Biomaterials* 19: 1677-1687.
- Dubreuil P., Pelletier G., Petitclerc D., Lapierre H., Couture Y., Morisset J., Gaudreau P., et Brazeau P.** (1987). Influence of age and sex on basal secretion of growth hormone (GH) and GH-induced release by porcine GH-releasing factor pGRF(1-29)NH₂ in growing pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 4: 299-307.
- Dubreuil P., Petitclerc D., Pelletier G., Gaudreau P., Farmer C., Mowles T.F., et Brazeau P.** (1990). Effect of dose and frequency of administration of a potent analog of growth hormone-releasing factor on hormone secretion and growth in pigs. *Journal of Animal Sciences* 68: 1254-1268.

- Dubreuil P., Petitclerc D., Gaudreau P., Brazeau P., et Pelletier G.** (1991). Effect of growth hormone-releasing factor infusion on somatotropin, prolactin, thyroxine, insulin, insulin-like growth factor I and blood metabolites in control and somatostatin-immunized growing pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 8: 307-321.
- Dumoulin Y., Clément P., Mateescu M.A., et Cartilier L.** (1994). Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in compressed tablets. *S.T.P. Pharma Sciences* 4: 329-335.
- Duncan E.** (1990). What is a biomaterial ? *Medical Device & Diagnostic Industry* 12: 138-142.
- Edman P., Björk E., et Rydén L.** (1992). Microspheres as nasal delivery system for peptide drugs. *Journal of Controlled Release* 21: 165-172.
- Einmahl S., Capancioni S., Schwach-Abdellaoui K., Moeller M., Behar-Cohen F., et Gurny R.** (2001). Therapeutic applications of viscous and injectable poly(ortho esters). *Advanced Drug Delivery Reviews* 53: 45-73.
- Farraj N.F., Johansen B.R., Davis S.S., et Illum L.** (1990). Nasal administration of insulin using bioadhesive microspheres as a delivery system. *Journal of Controlled Release* 13: 253-261.
- Ferrero C., Munoz-Ruiz A., et Jiménez-Castellanos M.R.** (2000). Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. *International Journal of Pharmaceutics* 202: 21-28.
- Flemming R.G., Murphy C.J., Abrams G.A., Goodman S.L., et Nealey P.F.** (1999). Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 20: 573-588.
- Flick A.B., Herbert J.C., Goodell J., et Kristiansen T.** (1986). Noncommercial fabrication of antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 223: 282-286.

- Ford J.L., Rubinstein M.H., et Hogan J.E.** (1985). Propranolol hydrochloride and aminophylline release from matrix tablets containing hydroxypropylmethylcellulose. *International Journal of Pharmaceutics* 24: 339-350.
- Forsberg J.O.** (1978). Transient blood flow reduction induced by intra-arterial injection of degradable starch microspheres. *Acta Chirurgica Scandinavica* 144: 275-281.
- Foster T.P.** (1999). Somatotropin delivery to farmed animals. *Advanced Drug Delivery Reviews* 38: 151-165.
- Garvin K.L., Miyano J.A., Robinson D., Giger D., Novak J., et Radio S.** (1994). Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 76-A: 1500-1506.
- Gelb H., Schumacher H.R., Cuckler J., et Baker D.G.** (1994). *In vivo* inflammatory response to polymethylmethacrylate particulate debris: effect of size, morphology, and surface area. *Journal of Orthopaedic Research* 12: 83-92.
- Giardino R., Rocca M., Fini M., Buscaroli S., Giavaresi G., Aldini N.N., Bacchini P., et Bertoni F.** (1992). Valutazioni sperimentali in vitro ed in vivo del rischio di infezione legato all'uso dei piu comuni fili di sutura. *Minerva Chirurgica* 47: 1799-1805.
- Gombotz W.R. et Pettit D.K.** (1995). Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjugate Chemistry* 6: 332-351.
- Gombotz W.R. et Wee S.F.** (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 267-285.
- González O., Smith R.L., et Goodman S.B.** (1996). Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* 30: 463-473.
- Goodman S.B., Fornasier V.L., et Kei J.** (1988). The effect of bulk versus particulate polymethylmethacrylate on bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 232: 255-262.

- Gopferich A.** (1996). Mechanism of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17: 103-114.
- Gray M.A.** (1995). Local application of antibiotics in orthopaedic infections. *Orthopaedic Nursing* 14: 69-70.
- Green T.R., Fisher J., Stone M., Wroblewski B.M., et Ingham E.** (1998). Polyethylene particles of a "critical size" are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials* 19: 2297-2302.
- Greenberg R.N., Kennedy D.J., Reilly P.M., Luppen K.L., Weinandt W.J., Bollinger M.R., Aguirre F., Kodesch F., et Saeed A.M.K.** (1987). Treatment of bone, joint and soft-tissue infections with oral ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31: 151-155.
- Greenberg R.N., Tice A.D., Marsh P.K., Craven P.C., Reilly P.M., Bollinger M.R., et Weinandt W.J.** (1987). Randomized trial of ciprofloxacin compared with other antimicrobial therapy in the treatment of osteomyelitis. *American Journal of Medicine* 82 Suppl. 4A: 266-269.
- Gristina A.G., Oga M., Webb L.X., et Hobgood C.D.** (1985). Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 228: 990-993.
- Grizzi I., Garreau H., Li S., et Vert M.** (1995). Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 16: 305-311.
- Hancock B.C., Carlson G.T., Ladipo D.D., Langdon B.A., et Mullarney M.P.** (2001). The powder flow and compact mechanical properties of two recently developed matrix-forming polymers. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 53: 1193-1199.
- Heller J., Barr J., Ng S., Shen H.-R., Schwach-Abdellaoui K., Emmahl S., Rothen-Weinhold A., et Gurny R.** (2000). Poly(ortho esters) - their development and some recent applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 121-128.
- Heller J., Barr J., Ng S., Shen H.-R., Schwach-Abdellaoui K., et Gurny R.** (2001). Development of poly(ortho esters). *Drug Delivery Systems & Sciences* 1: 79-84.

- Henry S.L., Hood G.A., et Seligson D.** (1993). Long-term implantation of gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 295: 47-53.
- Hickey T., Kreutzer D., Burgess D.J., et Moussy F.** (2002). Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. *Biomaterials* 23: 1649-1656.
- Higashi J.M. et Marchant R.E.** (1999). Implant infections. Dans Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials (Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., LaBerge M., et Lawrence W.H., Eds). 2ème édition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 493-506.
- Hirayama F. et Uekama K.** (1999). Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 36: 125-141.
- Holder Jr W.D., Gruber H.E., Moore A.L., Culberson C.R., Anderson W., Burg K.J.L., et Mooney D.J.** (1998). Cellular ingrowth and thickness changes in poly-L-lactides and polyglycolide matrices implanted subcutaneously in the rat. *Journal of Biomedical Materials Research* 41: 412-421.
- Holy C.E., Dang S.M., Davies J.E., et Shoichet M.S.** (1999). In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 20: 1177-1185.
- Hooper K.A., Macon N.D., et Kohn J.** (1998). Comparative histological evaluation of new tyrosine-derived polymers and poly(L-lactide acid) as a function of polymer degradation. *Journal of Biomedical Materials Research* 41: 443-454.
- Hunt J.A., Meijs G., et Williams D.F.** (1997). Hydrophilicity of polymers and soft tissue responses: a quantitative analysis. *Journal of Biomedical Materials Research* 36: 542-549.
- Hurrell S. et Cameron R.E.** (2001a). Polyglycolide: degradation and drug release. Part I: Changes in morphology during degradation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12: 811-816.

- Hurrell S. et Cameron R.E.** (2001b). Polyglycolide: Degradation and drug release. Part II: Drug release. *Journal of Materials Science: Materials in Medecine* 12: 817-820.
- Hurrell S. et Cameron R.E.** (2002). The effect of initial polymer porphology on the degradation and drug release from polyglycolide. *Biomaterials* 23: 2401-2409.
- Ibim S.M., Uhrich K.E., Bronson R., El-Amin S.F., Langer R., et Laurencin C.T.** (1998). Poly(anhydride-co=imides): in vivo biocompatibility in a rat model. *Biomaterials* 19: 941-951.
- Illum L., Jorgensen H., Bisgaard H., Krogsgaard O., et Rossing N.** (1987). Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 39: 189-199.
- Illum L., Farraj N.F., Critchley H., et Davis S.S.** (1988). Nasal administration of gentamicin using a novel microsphere delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 46: 261-265.
- Illum L., Fisher A.N., Jabbak-Gill I., et Davis S.S.** (2001). Bioadhesive starch microspheres and absorpction enhancing agents act synergistically to enhance the nasal absorpction of polypeptides. *International Journal of Pharmaceutics* 222: 109-119.
- Ishikawa T., Watanabe S., Takayama K., Endo H., et Matsumoto M.** (2000). Effcet of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) on the release profiles and bioavailability of poorly water-soluble drug from tablets prepared using macrogol and HPMC. *International Journal of Pharmaceutics* 202: 173-178.
- Ispas-Szabo P., Ravenelle F., Hassan I., Preda M., et Mateescu M.A.** (2000). Structure-properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release. *Carbohydrate Research* 323: 163-175.
- Jacob E., Setterstrom J.A., Bach D.E., Heath J.R., McNiesh L.M., et Cierny G.** (1991). Evaluation of biodegradable ampicillin anhydrate microcapsules for local treatment of experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 267: 237-244.

- Jacob E., Cierny G., Zorn K., McNeill J.F., et Fallon M.T.** (1997). Delayed local treatment of rabbit tibial fractures with biodegradable cefazolin microspheres. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 336: 278-285.
- Jagur-Grodzinski J.** (1999). Biomedical application of functional polymers. *Reactive & Functional Polymers* 39: 99-138.
- Jain A.K. et Panchagnula R.** (2000). Skeletal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 206: 1-12.
- Jane J., Xu A., Radosavljevic M., et Seib P.A.** (1992). Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linking reagents. *Cereal Chemistry* 69: 405-409.
- Jansen J.A., Dhert W.J.A., Van der Waerden J.P.C.M., et Von Recum A.F.** (1994). Semi-quantitative and qualitative histologic analysis method for the evaluation of implant biocompatibility. *Journal of Investigative Surgery* 7: 123-134.
- Johnson K.A.** (1994). Osteomyelitis in dogs and cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* 205: 1882-1887.
- Ju R.T.C., Nixon P.R., et Patel M.V.** (1995). Drug release from hydrophilic matrices. 1. New scaling laws for predicting polymer and drug release based on the polymer disentanglement concentration and the diffusion layer. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84: 1455-1463.
- Kanellakopoulou K., Kolia M., Anastasiadis A., Korakis T., Giamarellos-Bourboulis E.J., Andreopoulos A.G., Dounis E., et Giamarellou H.** (1999). Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluoroquinilones: an in vitro study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 714-716.
- Kanellakopoulou K. et Giamarellos-Bourboulis E.J.** (2000). Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 59: 1223-1232.

- Kanellakopoulou K., Galanakis N., Giamarellos-Bourboulis E.J., Rifiotis C., Papakostas K., Andreopoulos A.G., Dounis E., Karagianakos P., et Giamarellou H.** (2000). Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant staphylococcus aureus with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 311-314.
- Kidd K.R., Dal Ponte D.B., Kellar R.S., et Williams S.K.** (2001a). A comparative evaluation of the tissue responses associated with polymeric implants in the rat and mouse. *Journal of Biomedical Materials Research* 59: 682-689.
- Kidd K.R., Nagle R.B., et Williams S.K.** (2001b). Angiogenesis and neovascularization associated with extracellular matrix-modified porous implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 59: 366-377.
- Klindt J., Buoinomo J., Yen F.T., et Baile A.** (1995). Growth performance, carcass characteristics, and sensory attributes of boars administered porcine somatotropin by sustained-release implant for different lengths of time. *Journal of Animal Sciences* 73: 3585-3595.
- Klindt J., Yen F.T., Buoinomo J., Roberts A.J., et Wise T.** (1998). Growth, body composition, and endocrine responses to chronic administration of insulin-like growth factor I and (or) porcine growth hormone in pigs. *Journal of Animal Sciences* 76: 2368-2381.
- Kost J. et Shefer S.** (1990). Chemically-modified polysaccharides for enzymatically-controlled oral drug delivery. *Biomaterials* 11: 695-698.
- Kost J. et Langer R.** (1992). Responsive polymer systems for controlled delivery of therapeutics. *Trends in Biotechnology* 10: 127-131.
- Kubo T., Sawada K., Hirakawa K., Shimizu C., Takamatsu T., et Hirasawa Y.** (1999). Histiocyte reaction in rabbit femurs to UHMWPE, metal, and ceramic particles in different sizes. *Journal of Biomedical Materials Research* 45: 363-369.

- Laakso T., Artursson P., et Sjöholm I.** (1986). Biodegradable microspheres IV: Factors affecting the distribution and degradation of polyacryl starch microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75: 962-966.
- Langer R. et Peppas N.A.** (1981). Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials* 2: 201-214.
- Langer R., Cima L.G., Tamada J.A., et Wintermantel E.** (1990b). Future directions in biomaterials. *Biomaterials* 11: 738-745.
- Langer R.** (1990a). New methods of drug delivery. *Science* 249: 1527-1533.
- Le Bail P., Morin F.G., et Marchessault R.H.** (1999). Characterization of a crosslinked high amylose starch excipient. *International Journal of Biological Macromolecules* 26: 193-200.
- Leach K.J., Takahashi S., et Mathiowitz E.** (1998). Degradation of double-walled polymer microspheres of PLLA and P(CPP:SA)20:80. II. In vivo degradation. *Biomaterials* 19: 1981-1988.
- Leach K.J. et Mathiowitz E.** (1998). Degradation of double-walled polymer microspheres of PLLA and P(CPP:SA)20:80. I. In vitro degradation. *Biomaterials* 19: 1973-1980.
- Lenaerts V., Dumoulin Y., et Mateescu M.A.** (1991). Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *Journal of Controlled Release* 15: 39-46.
- Lenaerts V., Moussa I., Dumoulin Y., Mebsout F., Chouinard F., Ispas-Szabo P., Mateescu M.A., Cartilier L., et Marchessault R.H.** (1998). Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. *Journal of Controlled Release* 53: 225-234.
- Levine J.A., Jensen M.D., Eberhardt N.L., et O'Brien T.** (1998). Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth. *Journal of Clinical Investigation* 101: 1557-1564.
- Lew D.P. et Waldvogel F.A.** (1999). Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis. *Drugs* 58: 85-91.

- Li D.J., Ohsaki K., Li K., Cui P.C., Ye Q., Baba K., Wang Q.C., Tenshin S., et Takano-Yamamoto T.** (1999). Thickness of fibrous capsules after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. *Journal of Biomedical Materials Research* 45: 322-326.
- Li S. et McCarthy S.** (1999). Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials* 20: 35-44.
- Li S.M., Garreau H., et Vert M.** (1990a). Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(alpha-hydroxy acids) in aqueous media, Part I: Poly(DL-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1: 123-130.
- Li S.M., Garreau H., et Vert M.** (1990b). Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(alpha-hydroxy acids) in aqueous media, Part II: Degradation of lactide-glycolide copolymers: PLA37.5GA25 and PLA75GA25. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1: 131-139.
- Li S.M., Garreau H., et Vert M.** (1990c). Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(alpha-hydroxy acids) in aqueous media, Part III: Influence of the morphology of poly(L-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1: 198-206.
- Lu L., Peter S.J., Lyman M.D., Lai H.L., Leite S.M., Tamada J.A., Uyama S., Vacanti J.P., Langer R., et Mikos A.G.** (2000). In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials* 21: 1837-1845.
- Mackey D., Varlet A., et Debeaumont D.** (1982). Antibiotic loaded plaster of paris pellets: an in vitro study of possible method of local antibiotic therapy in bone infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 167: 263-268.
- Mader J.T., Cantrell J.S., et Calhoun J.** (1990). Oral ciprofloxacin compared with standard parenteral antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults. *Journal of Bone and Joint Surgery* 72: 104-110.

- Mader J.T., Landon G.C., et Calhoun J.** (1993). Antimicrobial treatment of osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 295: 87-95.
- Mader J.T., Shirliff M., et Calhoun J.** (1997). Staging and staging application in osteomyelitis. *Clinical Infectious Diseases* 25: 1303-1309.
- Mallapragada S.K. et Narasimhan B.** (1999). Drug delivery systems. Dans Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials (Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., LaBerge M., et Lawrence W.H., Eds). 2ème édition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 425-437.
- Marcoux M. et Bouré L.** (1998). Utilisation de l'antibiothérapie loco-régionale lors d'infection des extrémités chez le cheval. *Le Médecin Vétérinaire du Québec* 28: 171-175.
- Märtson M., Viljanto J., Hurme T., Laippala P., et Saukko P.** (1999). Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material ? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials* 20: 1989-1995.
- Mendes S.C., Reis R.L., Bovell Y.P., Cunha A.M., Van Blitterswijk C.A., et De Bruijn J.D.** (2001). Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery: a preliminary study. *Biomaterials* 22: 2057-2064.
- Meyle J.** (1993). Surface micromorphology and cellular interactions. *Journal of Biomaterials Applications* 7: 362-374.
- Mi F.-L., Tan Y.-C., Liang H.-F., et Sung H.-W.** (2002). In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* 23: 181-191.
- Mohanty M.** (1992). Evaluation of soft tissue response to a poly(urethane urea). *Biomaterials* 13: 651-656.
- Moussa I. et Cartilier L.** (1996). Characterization of moving fronts in cross-linked amylose matrices by image analysis. *Journal of Controlled Release* 42: 47-55.

- Moussa I. et Cartilier L.** (1997). Evaluation of cross-linked amylose press-coated tablets for sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 149: 139-149.
- Moussa I., Lenaerts V., et Cartilier L.** (1998a). Image analysis studies of water transport and dimensional changes occurring in the early stages of hydration in cross-linked amylose matrices. *Journal of Controlled Release* 52: 63-70.
- Moussa I., Lenaerts V., et Cartilier L.** (1998b). Effect of some physical parameters on the swelling properties of cross-linked amylose matrices. *International Journal of Pharmaceutics* 173: 35-41.
- Mulhbacher J., Ispas-Szabo P., Lenaerts V., et Mateescu M.A.** (2001). Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *Journal of Controlled Release* 76: 51-58.
- Nakamura T., Hitomi S., Watanabe S., Shimizu Y., Jamshidi K., Hyon S.H., et Ikada Y.** (1989). Bioabsorption of polylactides with different molecular properties. *Journal of Biomedical Materials Research* 23: 1115-1130.
- Neau S.H., Howard M.A., Claudius J.S., et Howard D.R.** (1999). The effect of aqueous solubility of xanthine derivatives on the release mechanism from ethylcellulose matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 179: 97-105.
- Nelson C.L., Hickmon S.G., et Harrison B.H.** (1994). Elution characteristics of gentamicin-PMMA beads after implantation in humans. *Orthopedics* 17: 415-416.
- Nie L., Nicoleau D.P., Tessier P.R., Kourea H.P., Browner B.D, et Nightingale C.H.** (1998). Use of a bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. *Journal of Orthopedic Research* 16: 76-79.
- Olfert E.D., Cross B.M., et McWilliam A.A.** (1993). Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care: Ottawa, ON. pp.
- Orloff L.A., Domb A.J., Teomim D., Fishbein I., et Golomb G.** (1997). Biodegradable implant strategies for inhibition of restenosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24: 3-9.

- Overbeck J.P. et Winckler S.T.** (1995). Penetration of ciprofloxacin into bone: a new bioabsorbable implant. *Journal of Investigative Surgery* 8: 155-162.
- Owusu-Ababio G., Rogers J., et Anwar H.** (1999). Effectiveness of ciprofloxacin microspheres in eradicating bacterial biofilm. *Journal of Controlled Release* 57: 151-159.
- Park H. et Park K.** (1996). Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems. *Pharmaceutical Research* 13: 1770-1776.
- Peppas N.A. et Langer R.** (1994). New challenges in biomaterials. *Science* 263: 1715-1720.
- Petty W., Spanier S., Shuster J.J., et Silverthorne C.** (1985). The influence of skeletal implants on incidence of infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 67-A: 1236-1244.
- Piattelli A., Scarano A., Coraggio F., et Matarasso S.** (1998). Early tissue reaction to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit. *Biomaterials* 19: 889-896.
- Picknell B., Mizen L., et Sutherland R.** (1977). Antibacterial activity of antibiotics in acrylic bone cement. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 59: 302-307.
- Pihlajamäki H., Kinnunen J., et Böstman O.** (1997). In vivo monitoring of the degradation process of bioresorbable polymeric implants using magnetic resonance imaging. *Biomaterials* 18: 1311-1315.
- Pitt C.G., Chasalow F.I., Hibionada Y.M., Klimas D.M., et Schindler A.** (1981a). Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) in vivo. *Journal of Applied Polymer Science* 26: 3779-3787.
- Pitt C.G., Gratzl M.M., Kimmel G.L., Surles J., et Schindler A.** (1981b). Aliphatic polyesters II. The degradation of poly(DL-lactic), poly(ϵ -caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 2: 215-220.

- Prior S., Gander B., Blarer N., Merkle H.P., et Subirá M.L.** (2002). In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15: 197-207.
- Pulapura S. et Kohn J.** (1992). Trends in the development of bioresorbable polymers for medical applications. *Journal of Biomaterials Applications* 6: 216-250.
- Rahmouni M., Chouinard F., Nekka F., Lenaerts V., et Leroux J.C.** (2001). Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on in vitro release of sodium diclofenac. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 51: 191-198.
- Rahmouni M., Lenaerts V., Massuelle D., Doelker E., et Leroux J.C.** (2002). Influence of physical parameters and lubricants on the compaction properties of granulated and non-granulated cross-linked high amylose starch. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 1155-1162.
- Ramchandani M. et Robinson D.** (1998). In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *Journal of Controlled Release* 54: 167-175.
- Ranade V.V.** (1990). Drug delivery systems. 4. Implants in drug delivery. *Journal of Clinical Pharmacology* 30: 871-889.
- Rao S.B. et Sharma C.P.** (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research* 34: 21-28.
- Ratner B.D.** (2002). Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis maround implant drug release systems. *Journal of Controlled Release* 78: 211-218.
- Ravenelle F., Marchessault R.H., Légaré A., et Buschmann M.D.** (2002). Mechanical properties and structure of swollen crosslinked high amylose starch tablets. *Carbohydrate Polymers* 47: 259-266.
- Remes A. et Williams D.F.** (1992). Immune response in biocompatibility. *Biomaterials* 13: 731-743.

- Reynolds T.D., Gerhke S.H., Hussain A.S., et Shenouda L.S.** (1998). Polymer erosion and drug release characterization of hydroxypropylmethylcellulose matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87: 1115-1123.
- Rihova B.** (1996). Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 21: 157-176.
- Rissing J.P.** (1997). Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 25: 1327-1333.
- Rushton N.** (1997). Applications of local antibiotic therapy. *European Journal of Surgery* 163: 27-30.
- Saito T., Takeuchi R., Hirakawa K., Nagata N., Yoshida T., Koshino T., Okuda K., Takema M., et Hori T.** (2002). Slow-releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite blocks implanted into MRSA osteomyelitis. *Journal of Biomedical Materials Research* 63: 245-251.
- Salthouse T.N.** (1984). Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *Journal of Biomedical Materials Research* 18: 395-401.
- Salzmann D.L., Kleinert L.B., Berman S.S., et Williams S.K.** (1997). The effect of porosity on endothelialization of ePTFE implanted in subcutaneous and adipose tissue. *Journal of Biomedical Materials Research* 34: 463-476.
- Sanborn S.L., Murugesan G., Marchant R.E., et Kottke-Marchant K.** (2002). Endothelial cell formation of focal adhesions on hydrophilic plasma polymers. *Biomaterials* 23: 1-8.
- Schierholz J.M. et Beuth J.** (2001). Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection* 49: 87-93.
- Schierholz J.M.** (2001). Drug delivery devices to enhance performance and improve outcome. *Drug Delivery Systems & Sciences* 1: 52-56.

- Sewell W.R., Wiland J., et Craver B.N.** (1955). A new method of comparing sutures of ovine catgut with sutures of bovine catgut in three species. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* : 483-494.
- Shanbhag A.S., Macaulay W., Stefanovic-Racic M., et Rubash H.E.** (1998). Nitric oxide release by macrophages in response to particulate wear debris. *Journal of Biomedical Materials Research* 41: 497-503.
- Sharkawy A.A., Klitzman B., Truskey G.A., et Reichert W.M.** (1997). Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. I. Diffusion properties. *Journal of Biomedical Materials Research* 37: 401-412.
- Sharkawy A.A., Klitzman B., Truskey G.A., et Reichert W.M.** (1998). Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. II. Plasma-tissue exchange properties. *Journal of Biomedical Materials Research* 40: 586-597.
- Shifan D., Ravenelle F., Mateescu M.A., et Marchessault R.H.** (2000). Change in the V/B polymorph ratio and T₁ relaxation of epichlorohydrin crosslinked high amylose starch excipient. *Starch/Stärke* 52: 186-195.
- Shillabeer G., Kumar V., Tibbo E., et Lau D.C.W.** (1998). Arachidonic acid metabolites of the lipoxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation. *Metabolism* 47: 461-466.
- Signorini M. et Campiglio G.L.** (1998). Posttraumatic lipomas: where do they really come from? *Plastic Reconstructive Surgery* 101: 699-705.
- Smith A.** (1999). Drug delivery systems in the 20th century: merely scratching the surface. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 2: 225-227.
- Sterppa H.K., Singer M.J., et Budsberg S.C.** (2001). Applications of local antimicrobial delivery systems in veterinary medicine. *Journal of American Veterinary Medical Association* 219: 40-48.
- Tang L., Liu L., et Elwing H.B.** (1998). Complement activation and inflammation triggered by model biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 41: 333-340.

- Tannenbaum G.S.** (1990). Interrelationship of somatostatin and growth hormone-releasing hormone in the genesis of the rhythmic secretion of growth hormone. *Acta Paediatrica Scandinavia* 367: 76-80.
- Taylor S.R. et Gibbons D.F.** (1983). Effect of surface texture on the soft tissue response to polymer implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 17: 205-227.
- Tesk J.A.** (2001). NIST workshop on reference data for the properties of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* 58: 463-466.
- Therin M. et Christel P.** (1992). In vivo degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids): validation of in vitro findings. *Biomaterials* 13: 594-600.
- Thompson W.W., Anderson D.B., et Heiman M.L.** (1997). Biodegradable microspheres as a delivery system for rismorelin porcine, a porcine-growth-hormone-releasing-hormone. *Journal of Controlled Release* 43: 9-22.
- Tizard Ian R.** (1996). Inflammation. Dans *Veterinary Immunology: An Introduction* (Saunders W.B., Eds). 5ème édition: Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 43-54.
- Tobias K.M., Schneider R.K., et Besser T.E.** (1996). Use of antimicrobial-impregnated polymethyl methacrylate. *Journal of American Veterinary Medical Association* 208: 841-845.
- Uhrich K.E., Ibim S.E.M., Larrier D.R., Langer R., et Laurencin C.T.** (1998). Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices. *Biomaterials* 19: 2045-2050.
- Van de Belt H., Neut D., Schenk W., Van Horn J.R., Van der Mei H.C., et Busscher H.J.** (2001). Staphylococcus aureus biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements. *Biomaterials* 22: 1607-1611.
- Van Luyn M.J.A., Plantinga J.A., Brouwer L.A., Khouw I.M.S.L., De Leij L.F.M.H., et Van Wachen P.B.** (2001). Repetitive subcutaneous implantation of different types of (biodegradable) biomaterials alters the foreign body reaction. *Biomaterials* 22: 1385-1391.

- Van Tienen T.G., Heijkants R.G.J.C., Buma P., De Groot J.H., Pennings A.J., et Veth R.P.H.** (2002). Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes. *Biomaterials* 23: 1731-1738.
- Vance M.L., Kaiser D.L., Martha P.M., Furnaletto R., Rivier J., Vale W., et Thorner M.O.** (1989). Lack of *in vivo* somatotroph desensitization of depletion after 14 days of continuous growth hormone (GH)-releasing hormone administration in normal men and GH-deficient boy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 68: 22-28.
- Verma R.K., Krishna D.M., et Garg S.** (2002). Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 79: 7-27.
- Vert M., Mauduit J., et Li S.** (1994). Biodegradable of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials* 15: 1209-1213.
- Von Fraunhofer J.A., Polk H.C., et Seligson D.** (1985). Leachong of tobramycin from PMMA bone cement beads. *Journal of Biomedical Materials Research* 19: 751-756.
- Von Recum A.F. et Van Kooten T.G.** (1995). The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants. *Journal of Biomaterials Science.Polymer Edition* 7: 181-198.
- Von Recum A.F., Jenkins M.E., et Von Recum H.A.** (1999). Introduction: Biomaterials and Biocompatibility. Dans Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials (Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., LaBerge M., et Lawrence W.H., Eds). 2nd edition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 1-8.
- Walboomers X.F., Croes H.J.E., Ginsel L.A., et Jansen J.A.** (1998). Microgrooved subcutaneous implants in the goat. *Journal of Biomedical Materials Research* 42: 634-641.
- Walboomers X.F. et Jansen J.A.** (2000). Microgrooved silicone subcutaneous implants in guinea pigs. *Biomaterials* 21: 636.

- Walenkamp G., Vree T.B., et Van Rens T.** (1986). Gentamicin-PMMA beads. Pharmacokinetic and nephrotoxicological study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 205: 171-183.
- Wetterö J., Askendal A., Bengtsson T., et Tengvall P.** (2002). On the binding of complement to solid artificial surfaces in vitro. *Biomaterials* 23: 981-991.
- Wiel J.-H.** (1990). Structure et métabolisme des glucides. Dans *Biochimie générale* (Masson, Eds). Sixième édition: Paris. pp. 151-183.
- Williams S.K., Berman S.S., et Kleinert L.B.** (1997). Differential healing and neovascularization of ePTFE implants in subcutaneous versus adipose tissue. *Journal of Biomedical Materials Research* 35: 473-481.
- Woo G.L.Y., Yang M.L., Yin H.Q., Jaffer F., Mittelman M.W., et Santerre J.P.** (2001). Biological characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer synthesized with fluoroquinolones. *Journal of Biomedical Materials Research* 59: 35-45.
- Wood N.K., Kaminski E.J., et Oglesby R.J.** (1970). The significance of implant shape in experimental testing of biological materials: disc vs. rod. *Journal of Biomedical Materials Research* 4: 1-12.
- Woodward S.C., Brewer P.S., et Moatamed F.** (1985). The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research* 19: 437-444.
- Woodward S.C.** (1999). Evaluation by light microscopy. Dans *Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials* (Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., LaBerge M., et Lawrence W.H., Eds). 2ème édition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 599-612.
- Yang L., Johnson B., et Fassihi R.** (1998). Determination of continuous changes in the gel layer thickness of poly(ethylene oxide) and HPMC tablets undergoing hydration: a texture analysis study. *Pharmaceutical Research* 15: 1902-1906.

Zange R. et Kissel T. (1997). Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly(D,L-lactide-co-glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 44: 149-157.

Zignani M., Le Minh T., Einmahl S., Tabatabay C., Heller J., Anderson J.M., et Gurny R. (2000). Improved biocompatibility of a viscous bioerodible poly(ortho ester) by controlling the environmental pH during degradation. *Biomaterials* 21: 1773-1778.

Accord et permission des coauteurs de l'article 1

Accord et permission des coauteurs de l'article 2

Accord et permission des coauteurs de l'article 3

Accord et permission des coauteurs de l'article 4

Autorisation de l'éditeur de l'article 1

Autorisation de l'éditeur de l'article 2

Autorisation de l'éditeur de l'article 3

Autorisation de l'éditeur de l'article 4

