



THESE
Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR

DE L'UNIVERSITE PARIS XIII

Discipline : Sciences de l'ingénieur
Mention Génie biologique
et médical

***Nouveaux Ciments Acryliques inhibiteurs de
l'adhérence bactérienne***

Présentée et soutenue par
Thomas Bauer

Membres du jury

Pr Anne-Claude Crémieux
Pr Philippe Hardy
Pr Patricia Thoreux
Mr Daniel Blanquaert
Pr Véronique Migonney

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

TABLE DE MATIERES

1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1.1.Problématique clinique : l'infection sur prothèse.....	7
1.1.1. LES ARTHROPLASTIES	7
1.1.2. INFECTIONS SUR PROTHESES.....	8
1.1.3. ADHERENCE BACTERIENNE ET FORMATION DU BIOFILM.....	10
1.2.Les ciments chirurgicaux	14
1.2.1. LES CIMENTS ACRYLIQUES (CA).....	15
1.2.2. LES CIMENTS AUX ANTIBIOTIQUES	17
1.3.Approches actuelles et futures pour la prévention et le traitement d'infections aux staphylocoques sur prothèses.....	23
1.3.1. LES NOUVEAUX CIMENTS INHIBITEURS DE L'ADHERENCE	27
2. MATERIEL ET METHODES.....	31
2.1.Production des échantillons de mélanges CERAFIX® /polyNaSS	31
2.1.1. LA PREPARATION DES ECHANTILLONS DE CIMENT.....	31
2.1.2. CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS.....	31
2.1.3. ANALYSES CHIMIQUES DE L'ETAT DE SURFACE DES MELANGES CIMENT/POLYMERE.....	32
2.2.Adsorption de l'albumine et de protéines plasmatiques sur les échantillons de CERAFIX® avec et sans polyNass.....	32
2.3.Culture de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.3.1. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE LIQUIDE	33
2.3.2. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE SEMI SOLIDE (GELOSES)	33
2.3.3. MESURE DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE PAR TURBIDIMETRIE	34
2.3.4. PROLIFERATION BACTERIENNE EN MILIEU LIQUIDE	34
2.4. Evaluation de l'adhérence bactérienne sur les ciments.....	34
2.5. Interactions ostéoblastes/ ciments.....	35
2.5.1. CULTURE D'OSTEOBLASTES	35
2.5.2. VIABILITE DES OSTEOBLASTES.....	36
2.5.3. MORPHOLOGIE DES OSTEOBLASTES.....	36
2.5.4. PROLIFERATION DES OSTEOBLASTES.....	37
2.6. Analyse statistique	37
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	39
3.1.Production des mélanges	

de poly(styrène sulfonate de sodium) polyNaSS/ciments	39
3.1.1. ETUDE DU RELARGAGE DE POLYNASS PAR LE MELANGE CERAFIX®/POLYNASS	40
3.2.Adsorption d'albumine sur le mélange ciment CERAFIX®/polyNaSS	40
3.3.Adhérence bactérienne sur des échantillons de ciments et de mélanges CERAFIX®/polyNaSS:.....	42
3.3.1. ADHERENCE DE S AUREUS SUR DES SURFACES PREADSORBEES DE FIBRINOGENE	43
3.3.2. ADHERENCE DE S AUREUS SUR DES SURFACES PREADSORBEES DU PLASMA	46
3.4.Biocompatibilité <i>in vitro</i> des ciments CERAFIX®/polyNaSS	49
3.5.Production des mélanges CERAFIX®/ copolymères poly(méthyl méthacrylate-co-styrène sulfonate de sodium).....	53
3.5.1. MESURE DE L'ANGLE DE CONTACT	53
3.5.2. CINETIQUE DE RELARGAGE DES POLYMERES INTRODUITS DANS LE CIMENT	54
3.6.Adsorption d'albumine sur les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS.....	55
3.7.Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des surfaces CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS	56
3.8.Adhérence de <i>Staphylococcus aureus</i> sur les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS	57
3.8.1. ADHERENCE DE S AUREUS SUR LES CIMENTS CERAFIX®/ MMA/NaSS 95/5	57
3.8.2. ADHERENCE DE S AUREUS SUR LES CIMENTS CERAFIX®/ MMA/NaSS 90/10	59
3.8.3. ADHERENCE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUR LES CIMENTS CERAFIX®/ MMA/NaSS 60/40	61
3.9.Observation des bactéries adhérentes sur les surfaces CERAFIX®/MMA NaSS par MEB.....	63
3.10.Biocompatibilité <i>in vitro</i> des ciments CERAFIX®/MMA NaSS.....	65
3.11.Adhérence de <i>Staphylococcus aureus</i> sur les mélanges CERAFIXGENTA® /copolymère MMA/NaSS	67
3.12.Adhérence de <i>S aureus</i> sur les ciments CERAFIXGENTA®/ MMA/NaSS 95/5	67
3.13.Adhérence de <i>Staphylococcus aureus</i> sur les ciments CERAFIXGENTA®/ MMA/NaSS 90/10	69
3.14.Adhérence de <i>S aureus</i> sur les ciments CERAFIXGENTA®/ MMA/NaSS 60/40	70
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	76
5. REFERENCES.....	78

Chapitre 1

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Problématique clinique : l'infection sur prothèse

1.1.1. LES ARTHROPLASTIES

Le remplacement total ou partiel d'une articulation par un implant prothétique est appelé arthroplastie. Il existe de nombreux types d'arthroplasties différentes. Dans le cas de la hanche, les arthroplasties impliquant le remplacement de la tête fémorale peuvent être divisées en deux groupes: les hémiarthroplasties et les remplacement totaux de la hanche (PTH). L'hémiarthroplastie consiste à remplacer la tête fémorale avec une prothèse, tout en conservant le cotyle naturel et le cartilage cotyloïdien. La PTH comprend le remplacement du cotyle, en plus de la tête fémorale. Différents types de prothèses (Fig 1-A) peuvent être utilisés dans le traitement chirurgical d'une fracture de l'extrémité proximale du fémur. Les différences principales entre les implants résident dans la conception des tiges. Les tiges fémorales peuvent soit être maintenues ajustées par pression ou immobilisées à l'intérieur de l'os à l'aide d'un produit de remplissage (ciment acrylique). Le composant acétabulaire peut être une combinaison de polyéthylène haute densité et de métal, ou de céramique et de métal. Il est soit cimenté soit impacté pour sa mise en place.

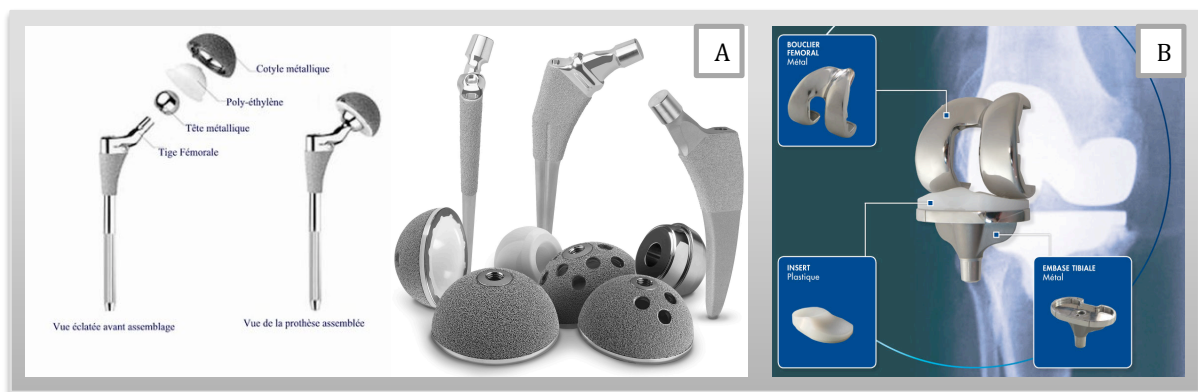


Figure 1 : exemples de prothèses de hanche en quatre pièces (A) ; exemple de prothèse de genou (B).

Les arthroplasties de genou (PTG) sont en majorité cimentées, selon des données bibliographiques, 85% des PTG posées aux Etats-Unis dans la période 2002-2006 ont été cimentées¹. De plus, la majorité des arthroplasties totales de d'autres articulations, comme

l'épaule et le coude, sont cimentés presque systématiquement. Dans les arthroplasties totales primaires une proportion importante des prothèses est ancrée à l'os contigu avec du ciment osseux acrylique. Parker *et al* 2010 montrent dans étude sur vingt-trois essais cliniques (portant sur 2861 patients) que les patients dont les prothèses sont fixées à l'aide de ciment présentent moins de douleurs et une plus grande mobilité après l'opération que ceux dont les prothèses sont ajustées par pression².

1.1.2. INFECTIONS SUR PROTHESES

Un des problèmes majeurs rencontrés lors de la mise en contact de biomatériaux (cathéters, dispositifs de circulation extracorporelle, implants intraoculaires) avec les systèmes biologiques est l'infection bactérienne. Dans le cas de dispositifs implantés, ces infections s'avèrent difficiles à traiter. En chirurgie orthopédique prothétique l'infection est une complication grave. L'infection sur prothèse, dans le premier mois après son implantation, est considérée comme une infection liée aux soins (nosocomiale) de type infection de site opératoire (ISO)³.

L'infection sur prothèses articulaire est la deuxième cause d'échec, après le descellement. Elle est estimée en France entre 2000 et 2500 cas par an et représente un problème majeur pour la prise en charge des patients. Une revue systématique de la littérature sur les infections du site opératoire après arthroplastie primaire totale de hanche a rapporté un taux d'incidence estimé avant la sortie de 0,2 % et des taux d'incidence allant de 0,2 % à 0,9 % dans les 90 jours postopératoires⁴.

Un des défis pour ces procédures est la prévention de l'infection, car en dépit des contrôles stricts de protocoles per-opératoires, des protocoles d'antibioprophylaxie et du traitement de l'air dans les salles d'opération (flux laminaire), l'infection profonde périprothétique persiste et représente une complication grave. La mise en place de mesures préventives (antibioprophylaxie, préparation cutanée de l'opéré, etc.) a réduit le risque d'infection peropératoire à moins de 1 % pour les prothèses de hanche et à moins de 2 % pour les prothèses de genou⁵.

Le milieu interstitiel entourant les implants prothétiques est connu pour représenter une zone de dépression immunitaire locale et un « *resistentiae locus minoris* », souvent désigné comme zone immuno-incompétente fibro-inflammatoire⁶, sensible à la colonisation microbienne, et

favorable au développement d'infections⁷. Les modèles expérimentaux ont montré que la dose critique de contamination par des microorganismes nécessaire pour produire l'infection est beaucoup plus faible quand un matériau étranger est présent sur le site chirurgical⁸. En outre, en orthopédie, les micromouvements des prothèses insérées dans les tissus durs et la libération nuisible de débris d'usure, comme dans le cas d'une PTH, peuvent endommager les tissus entourant l'implant, en créant des conditions où les défenses immunitaires sont généralement épuisées. De plus, l'immunodépression locale présente dans le tissu péri-prothétique facilite généralement la survenue d'une infection pour tous les matériaux de l'implant. Cependant, la nature chimique et la topographie superficielle de matériaux implantaires influencent l'adhérence microbienne et conditionnent les chances de succès de la colonisation de la prothèse. Les bactéries responsables d'infections sur prothèses articulaires sont en majorité les staphylocoques (Figure 2).

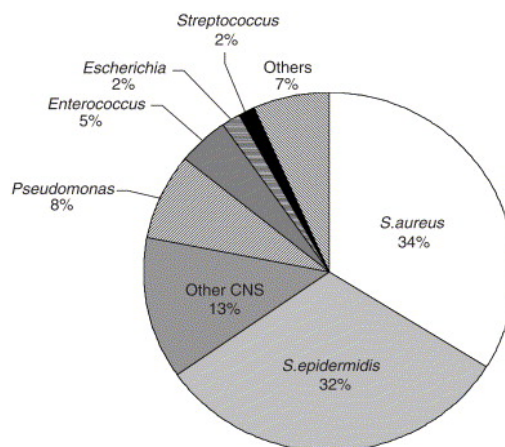


Figure 2 : Fréquence des principales espèces pathogènes parmi les isolats cliniques d'infections associées aux implants orthopédiques ; Campoccia et al Biomaterials 2006⁹

Ces infections sont souvent dues à des *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* résistantes à la méticilline, mais aussi à des souches sensibles à la méticilline de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*, et *Pseudomonas aeruginosa*⁹. Le Tableau 1 présente de manière plus détaillée les principales bactéries isolées dans les infections ostéoarticulaires sur matériel (<3 mois après la pose de la prothèse) décrites dans des études récentes¹⁰⁻¹². Il est à noter que les infections poly microbiennes représentent 32 à 46% des cas.

Microorganismes	Pourcentage en fonction des études
Staphylococcus	75 % - 88 %
<i>S. aureus</i>	42 % - 55 %
<i>S. aureus</i> MS	27 % - 37.7 %
<i>S aureus</i> MR	8 % - 26 %
<i>S. coagulase négative</i>	21 % - 48 %
Bacilles à gram négatif	14 % - 39 %
Entérobactéries	7 - 32 %
<i>Acinetobacter spp.</i>	0.5 - 3.9 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,3 - 12 %
<i>Streptococcus</i>	19.5 %
<i>Streptococcus spp.</i>	3 - 6,5 %
<i>Enterococcus spp.</i>	12 % - 16 %
<i>Corynebacterium spp.</i>	2% - 19,5 %
Anaérobies	8 %
Infections polymicrobiennes	32 - 46 %
Mycobactéries	exceptionnellement décrits
Levures	
Groupe HACEK (<i>Haemophilus, Kingella, Aggregatibacter, Capnocytophaga, Eikenella</i>)	

Tableau 1 : Principales bactéries isolées dans les infections ostéoarticulaires sur matériel (<3 mois après la pose de la prothèse) ; Peel 2012, Moran 2007, Byren 2009¹⁰⁻¹²

1.1.3. ADHERENCE BACTERIENNE ET FORMATION DU BIOFILM

L'infection sur matériaux prothétiques débute par l'adhérence des bactéries à la surface (revu par Arciola et al 2015¹³). L'adhérence bactérienne sur une surface implantée dépend de différents paramètres : les facteurs de l'hôte (âge, immunodéficience, état physique), la nature de la souche (les microorganismes qui sont impliqués dans le développement des infections sur corps étrangers sont très nombreux) et les propriétés physicochimiques de la surface. De nombreux travaux réalisés *in vitro* montrent, que l'adhérence des bactéries sur des matériaux synthétiques est fortement influencée par les protéines de l'hôte adsorbées sur la surface de l'implant^{14,15}. L'interaction entre *Staphylococcus* et les protéines de l'hôte adsorbées sur les dispositifs médicaux impliquent des récepteurs bactériens de nature protéique. Ces récepteurs appelés adhésines reconnaissent des domaines spécifiques des protéines telles que la fibronectine, le fibrinogène ou la fibrine^{16,17}.

Les micro-organismes infectieux peuvent être introduits au cours de l'implantation ou dériver d'une bactériémie temporaire. Ils adhèrent à des biomatériaux et prolifèrent pour former un biofilm. L'adhérence bactérienne est considérée comme un facteur

de virulence, car elle conduit les bactéries à produire des exo-polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques et des lipides, à travers lesquels les bactéries se développent dans une matrice protectrice (Figure 3). Cette matrice assure la stabilité mécanique du biofilm¹⁸. Malgré les nombreuses définitions possibles, le biofilm bactérien peut tout simplement être décrit comme un consortium structuré de bactéries enkystées dans une matrice autoproduite. La formation du biofilm suit un processus divisé en quatre étapes (Figure3) :

- 1) attachement initial des bactéries
- 2) attachement via les adhésines, agrégation cellulaire et accumulation des multiples couches bactériennes
- 3) maturation du biofilm
- 4) détachement de bactéries du biofilm et dispersion des bactéries pour initier ailleurs un nouveau cycle de formation de biofilm^{19,20}.

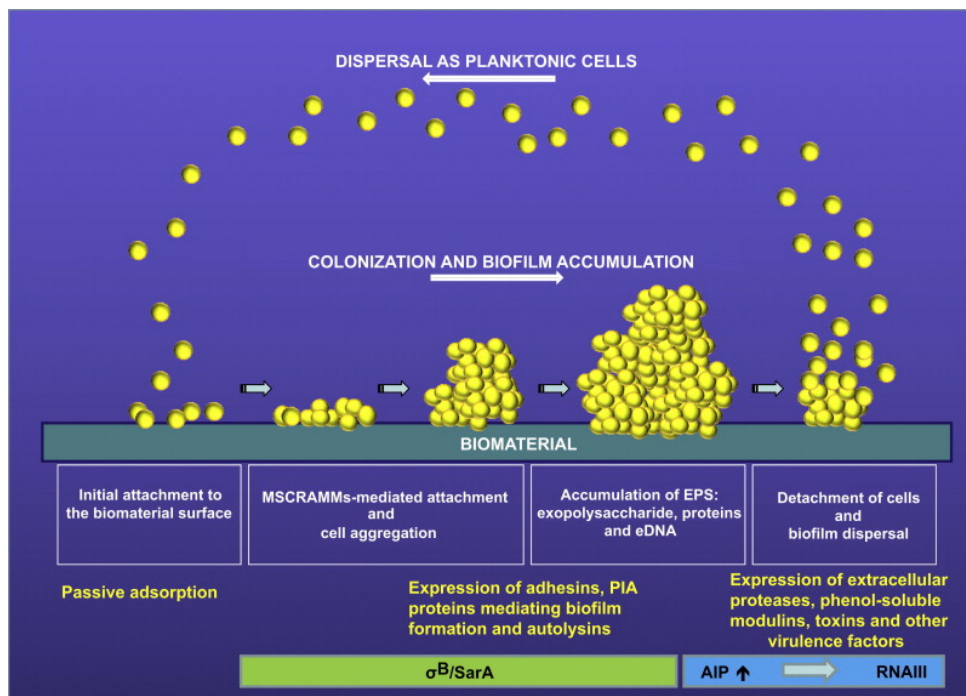


Figure 3 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm
*Arciola et al 2012*¹⁸

Les bactéries organisées dans les biofilms sont de 10 à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries dans un état planctonique (ou proliférant en suspension). Ces propriétés leur permettent de faire face aux conditions extérieures défavorables dans le

système immunitaire de l'hôte. Dans une revue récente Mc Conoughey *et al* ²¹ soulignent l'importance de la formation de biofilm, non seulement sur le corps étranger, mais également sur les tissus mous et les os adjacents. Trois emplacements anatomiques - le fluide environnant (liquide articulaire), le corps étranger et le tissu sous la surface - pourraient représenter des réservoirs individuels d'infection, chacun contenant des bactéries dans différents états phénotypiques. A partir de ces réservoirs, les bactéries pourraient recoloniser si elles ne sont pas complètement éradiquées par des moyens tels que le lavage, l'antibiothérapie ou débridement chirurgical. La Figure 4 montre un schéma de la distribution possible des bactéries pathogènes dans un espace commun à l'aide d'un exemple de prothèse de genou.

Les infections associées aux matériaux ostéoarticulaires ne répondent souvent pas au traitement par les antibiotiques seuls et le retrait de la prothèse est alors nécessaire pour éradiquer l'infection entraînant des coûts élevés pour les systèmes de santé et de grands inconvénients pour le patient (séquelles fonctionnelles) ²².

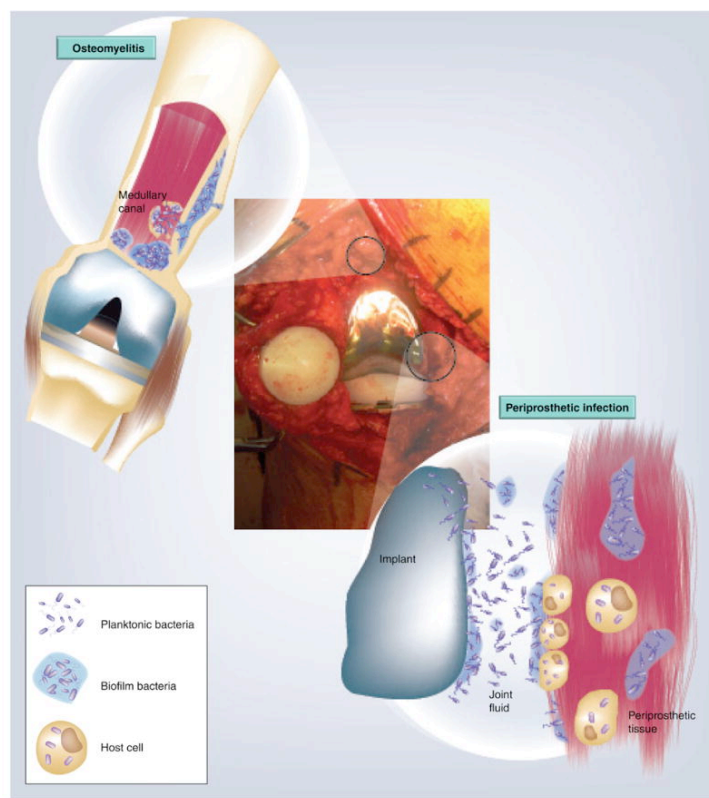


Figure 4 : Comment les bactéries et les biofilms pourraient être distribués dans une infection de l'articulation périprothétique utilisant un genou comme un exemple.

Mc Conoughey SJ Future Microbiol, 2014²¹

Les cellules bactériennes qui résident dans les zones périphériques du biofilm sont les plus exposées aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques, mais ces micro-organismes sont capables de développer plusieurs systèmes de protection. La matrice et les couches cellulaires dans le biofilm créent une barrière physique qui ralentit la pénétration et la diffusion des antibiotiques. L'activité métabolique dans les zones externes du biofilm pourrait favoriser la création des zones anoxiques acides conduisant à la dégradation de l'antibiotique²³. En outre, les polymères sécrétés qui constituent la matrice extracellulaire du biofilm peuvent se lier et désactiver les antibiotiques, formant un «puits» d'antibiotique²⁴. De plus, l'épuisement des nutriments à l'intérieur du biofilm peut conduire à la dormance bactérienne induite. Le transport et la diffusion limitée, la liaison aux composants de la matrice et l'absorption par des bactéries peuvent créer un gradient de concentration en antibiotique. Ce gradient expose une sous-population de bactéries à l'intérieur du biofilm à une dose sub létale d'antibiotiques. L'exposition sub létale a été montrée comme étant un facteur du développement de la tolérance aux antibiotiques en augmentant la formation de biofilm^{25, 26}. En raison de ces diverses stratégies de défense lorsque les bactéries sont cultivées sous forme de biofilm, la CMI des certains antibiotiques peut être augmentée jusqu'à 1000 fois et dans le cas de *S. aureus* sensible à la méthicilline, les CMI constatés sont proches de celles normalement associés aux souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline^{27, 28}. En plus des mécanismes de tolérance spécifique du biofilm, les bactéries du biofilm utilisent également des mécanismes de résistance classiques; par exemple, des β -lactamases sont libérés des biofilms dans le but de dégrader les β -lactamines extracellulaires (pénicillines et céphalosporines entre autres), communément utilisées pour traiter les infections orthopédiques. Les bactéries du biofilm peuvent aussi réguler positivement l'expression de pompes à efflux pour éliminer les antibiotiques qui ont pénétré avec succès dans le compartiment intracellulaire bactérien²⁹.

Il est actuellement reconnu que l'éradication de biofilms après leur formation est très difficile voire impossible, pour cette raison, la prévention de l'infection suite à l'implantation des prothèses et des dispositifs médicaux continue de faire l'objet d'intenses recherches en orthopédie^{13, 18} et dans d'autres spécialités. En plus de l'amélioration des précautions d'hygiène et la mise en place de l'antibioprophylaxie, la prévention de ces infections nécessite également des modifications physiques et/ou chimiques des prothèses afin de les rendre capables d'induire une diminution de l'adhérence et/ou de la multiplication bactérienne.

Cependant, les biofilms bactériens peuvent également se développer sur le tissu péri prothétique, en conséquence la protection de la prothèse seule par des molécules

antimicrobiennes ne semble pas être suffisante. Idéalement, la surface du matériau devrait être capable de projeter son effet antimicrobien sur les tissus et les fluides adjacents²¹.

1.2. Les ciments chirurgicaux

Les ciments chirurgicaux ont été utilisés avec succès depuis plus d'un demi siècle. Deux types de ciments osseux peuvent être distingués les ciments phosphocalciques (CPC) et les ciments acryliques (CA).

Les CPC ont été créés dans les années 1980 et depuis différentes compositions des CPC ont été étudiées et sont commercialement disponibles³⁰. Les CPC (Figure 1) sont obtenus par réaction chimique entre deux phases - une solide et une liquide. La phase solide comprend un ou plusieurs composés de phosphate de calcium. La phase liquide est une solution aqueuse pouvant contenir du calcium, du phosphate et différents composés tels que l'alginate et l'hyaluronate³¹.

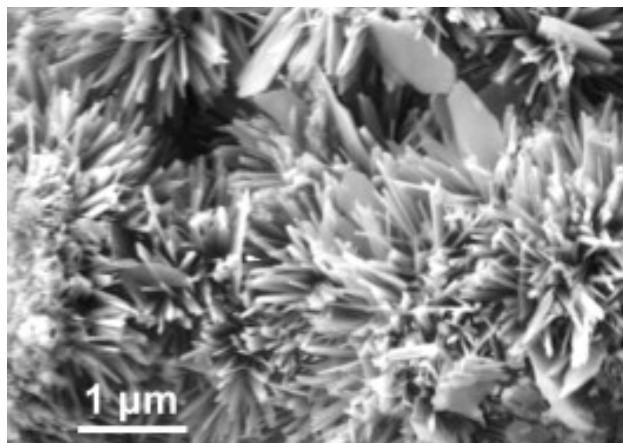


Figure 5 : Microscopie Electronique à Balayage (MEB) d'une surface CPC montrant cristaux en forme d'aiguilles ; Zhang et al 2014³²

Actuellement, malgré les nombreuses formulations du CPC, il y a seulement deux produits finaux possibles pour la réaction CPC: la « brushite » (phosphate dicalcique dihydraté) et l'apatite, comme l'hydroxyapatite déficiente en calcium ou d'hydroxyapatite³⁰. Les CPC sont des ciments ioniques utilisés comme des substituts osseux car ils s'adaptent facilement aux défauts osseux. Cependant certaines réactions inflammatoires ont été rapportées lors d'utilisation de trop grandes quantités de ciment. Lorsque leur structure est trop dense et leur

macroporosité insuffisante après durcissement la colonisation cellulaire peut être compromise³².

1.2.1. LES CIMENTS ACRYLIQUES (CA)

Notre intérêt porte sur les CA du Laboratoire CERAVÉR³³ utilisés pendant mes travaux de recherche, ils seront donc décrits en détail dans ce manuscrit. Le Poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA) composant principal des CA, a été utilisé en orthopédie depuis le début des années 1960³⁴. Il agit comme un agent de scellement pour la fixation de prothèses articulaires ainsi que pour le traitement de certaines fractures-tassements des corps vertébraux (vertébroplastie). Dans les arthroplasties totales (TJR total joint replacement), le ciment osseux remplit l'espace entre la prothèse et l'os et agit comme un tampon élastique. Par conséquent il permet le transfert de charge mécanique de l'implant à l'os. La distribution des contraintes est une fonction déterminante pour la longévité de l'implant. Si les contraintes externes dépassent la capacité de transfert de charge du ciment, il en résulte une fracture du ciment³⁵.

Composition et réaction de polymérisation de ciments acryliques

Les ciments osseux acryliques sont des systèmes à deux phases, consistant en (a) une poudre de polymère et (b) du monomère liquide. La phase de poudre se compose essentiellement de billes sphériques de Poly(méthyl méthacrylate) PMMA (82-89 % en poids) et d'un agent radio-opacifiant inorganique, généralement le sulfate de baryum ou de zirconium dioxyde de carbone (10 à 15% en poids). Le composant en poudre contient aussi du peroxyde de benzoyle (BPO) (0,5-2,6 % en poids), catalyseur de la polymérisation. La phase liquide est essentiellement composée d'un monomère, le méthyl méthacrylate MMA (98 % en poids) et 2% en poids de N, N-diméthyl-p-toluidine (DmpT) accélérateur de la polymérisation. D'un point de vue chimique, le MMA est un ester de l'acide méthacrylique avec une double liaison polymérisable. Lorsque les deux phases (liquide et en poudre) sont mélangées, l'initiateur (BPO) réagit avec l'accélérateur (DmpT) pour former des radicaux libres (initiation de la réaction). Ces radicaux libres amorcent la polymérisation du MMA en PMMA par ajout à la double-liaison polymérisable de la molécule de monomère. Les températures durant cette réaction peuvent atteindre jusqu'à 110°C. Au cours de la polymérisation, le ciment est

travaillé en une phase de «pâte» qui peut être moulée ou injectée. En relativement peu de temps (10 -15 minutes) le ciment osseux durcit à environ 90% de ses propriétés mécaniques finales³⁵.

Chaque ciment est caractérisé par plusieurs paramètres tels que ³⁶:

-*Le temps de prise*, qui correspond à l'intervalle entre le début du mélange des deux composants et le durcissement du ciment. (Liquide →gel plus ou moins pâteux→ solide en polymérisant). Le temps de prise est variable suivant la composition, la température du ciment et la température de la salle d'opération.

-*La chaleur dégagée*, elle est causée par la réaction de polymérisation fortement exothermique. Cette chaleur dépend du rapport surface/volume, pour cette raison et afin de ne pas induire la dénaturation des protéines ni de nécrose osseuse, l'épaisseur de la couche de ciment entre l'os et l'implant doit être limitée.

-*La variation de volume*, se manifeste entre le début du mélange et la fin de la polymérisation.

-*La viscosité*, plus le ciment est fluide, mieux il pénétrera dans les interstices.

-*La porosité*, la présence de bulles dans le ciment s'explique par le fait que l'air s'introduit pendant le mélange et aussi par l'évaporation du monomère qui est volatil. La porosité influence les propriétés mécaniques du ciment : plus la porosité est grande et moins bonnes sont les caractéristiques mécaniques (Figures 6 et 7).

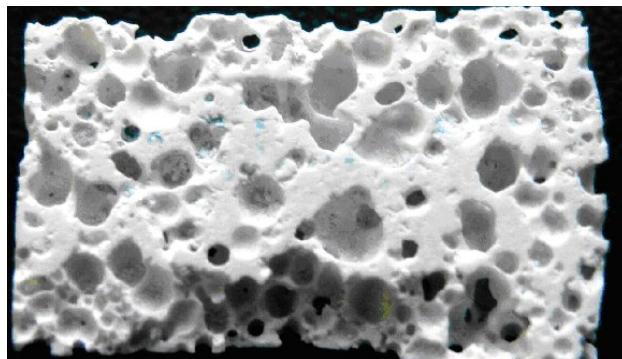


Figure 6 : image macroscopique d'un ciment acrylique commercial avec de pores de tailles différentes (photo CIRIMAT 2005)

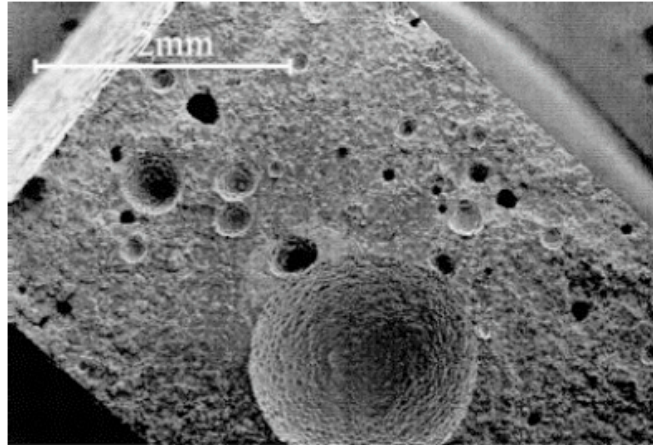


Figure 7 : MEB d'un ciment acrylique commercial ; la surface montre de pores de tailles différentes ; Murphy and Prendergast 2000³⁷

Les propriétés mécaniques varient suivant la composition du ciment, cependant tous doivent répondre à un cahier de charges sur des critères³⁶ tels que :

- (a) la résistance à la rupture : en traction, en compression, en flexion, en cisaillement ;
- (b) la résistance à la fracture ;
- (c) le module d'Young ;
- (d) la densité ;
- (e) la résistance à la fatigue ;
- (f) la propagation des fractures.

Les CA ont montré leur efficacité cependant il persiste des échecs dans 5 à 20 % de cas suite au descellement de prothèses à 10 ans. Souvent le CA est incriminé, bien que les conditions d'utilisation lors de son implantation constituent un paramètre important pouvant conditionner ces échecs. En dehors de leur utilisation comme élément de fixation immédiat d'un implant, ce dispositif médical peut permettre le relargage local d'un principe actif de type antibiotique ou antimitotique.

1.2.2. LES CIMENTS AUX ANTIBIOTIQUES

Les premiers ciments additionnés d'antibiotiques ont été utilisés au cours des années 1970³⁸ pour la fixation des arthroplasties totales de hanche en prophylaxie anti infectieuse. L'objectif de ces ciments est de traiter l'infection localement grâce à la diffusion de l'antibiotique à

partir du ciment. Il s'agit d'une antibiothérapie prophylactique qui constitue l'un des moyens pour atteindre les germes qui se trouvent à l'interface ciment-os ou ciment-prothèse. Les ciments osseux peuvent ainsi fonctionner en tant que matrice de libération locale d'antibiotiques. En raison de la haute concentration locale d'antibiotique dans l'environnement de l'implant, l'utilisation de ciments osseux a des avantages par rapport à un traitement antibiotique systémique. De nombreux auteurs ont repris ensuite cette technique de cimentage utilisant la gentamicine ou d'autres antibiotiques^{39, 40} obtenant des résultats comparables.

Plusieurs conditions doivent être réunies pour permettre l'utilisation d'un antibiotique dans un ciment osseux. Tout d'abord, l'antibiotique doit pouvoir se mélanger simplement et de manière uniforme au ciment, sans altérer les propriétés mécaniques de celui-ci. Tous les antibiotiques ne sont pas adaptés à une thérapie locale dans un ciment osseux. L'antibiotique doit également posséder d'autres propriétés telles que ³⁵:

- Ne pas se dénaturer par l'élévation de température provoquée par la réaction de polymérisation. Les antibiotiques doivent être thermostables et sous forme de poudre, car les antibiotiques liquides gênent la polymérisation et empêchent la création de porosités (qui permettent la libération)
- Ne pas avoir d'incidence sur les caractéristiques mécaniques du ciment
- Etre soluble dans l'eau
- Avoir un spectre antibactérien large, y compris pour germes gram (+) et gram (-)
- Avoir un effet bactéricide même à basse concentration
- Etre actif contre les microorganismes rencontrés sur les prothèses
- Ne pas développer de résistances
- Avoir des liaisons protéiniques réduites
- Ne pas provoquer d'allergies.
- Présenter un potentiel de relargage à partir de la matrice ciment: le relargage de l'antibiotique ne se fait qu'à partir d'une épaisseur superficielle du ciment. La plus grande partie des antibiotiques restera confinée dans le ciment pour toute la durée de vie de l'arthroplastie. Il est également important d'obtenir un mélange homogène des antibiotiques dans le ciment. L'efficacité du traitement antibiotique doit inclure un niveau initial élevé, avec un relargage progressif et contrôlé sur les jours, voire les semaines suivantes³⁵.

Il existe un nombre élevé de molécules d'antibiotiques classifiés selon plusieurs critères: origine, nature chimique, mode d'action, modalité d'action et spectre. Leur mode d'action bien que parfois imparfaitement connu, est d'une grande variabilité, voire complexité. La Gentamicine est employée dans la plupart des ciments antibiotiques, c'est l'antibiotique de référence depuis le début des années 1970, en raison de son large spectre antibactérien et de ses propriétés physico-chimiques (Tableau 2).

Constituent	Cemex [®] XL Genta LV ^b	Copal ^{®c}	Endurance [™] Gentamicin ^d	Palacos [®] R+G ^e	SmartSet [®] GHV ^f
Powder					
Poly(methyl methacrylate) (PMMA)	82.78	–	65.28	–	–
Methyl methacrylate (MMA)/styrene co-polymer	–	–	18.65	–	–
PMMA/MMA co-polymer	–	82.65	–	82.15	80.46
Benzoyl peroxide (BPO)	3.00	0.75	1.85	0.78	0.96
Barium sulfate	10.00	–	10.00	–	–
Zirconium dioxide	–	10.03	–	15.01	14.37
Gentamicin sulfate	4.22 ^g	3.76 ^g	4.22 ^g	2.06 ^h	4.22 ^g
Clindamycin hydrochloride	–	2.82	–	–	–
Chlorophyll	–	0.002	–	0.002	–
Liquid monomer					
MMA	98.20	97.98	98.00	97.98	97.50
<i>N,N</i> dimethyl- <i>p</i> -toluidine (DMPT) (max.)	1.80	2.02	≤ 2.00	2.02	≤ 2.50
Hydroquinone	75	75	75	75	75
Chlorophyll	–	0.002	–	0.002	–

^a The amount of each constituent of a cement is in wt./wt.%, except for hydroquinone, which is ppm.
^b Tecres SpA, Verona, Italy.
^c Merck Biomaterials GmbH, Darmstadt, Germany.
^d DePuy CMW, Blackpool, UK.
^e Heraeus Kulzer GmbH, Wertheim, Germany.
^f DePuy Orthopaedics, Warsaw, IN, USA.
^g (=1.0 g base).
^h (=0.5 g base).

Tableau 2 : Composition de 5 ciments commerciaux chargés en antibiotiques
*Lewis et al 2008*¹

Des expériences de libération d'antibiotique à partir du ciment *in vitro* et *in vivo* ont permis d'expliquer l'efficacité clinique de la gentamicine en prophylaxie par des zones de fortes concentrations locales supérieures à celles obtenues par traitement par voie générale⁴¹.

Les conditions d'utilisation de systèmes de libération locale d'antibiotiques, y compris à partir de ciments osseux dans le traitement d'infection sont actuellement bien décrites⁴² (Figure 8). Il a été montré qu'au moins 3,6 g d'antibiotique par 40 g de ciment acrylique est souhaitable afin d'obtenir une cinétique d'éluion efficace et des niveaux thérapeutiques prolongés de l'antibiotique^{43,44}. Il existe deux types de ciments aux antibiotiques: (a) les formulations pré-mélangées, commercialement disponibles dans lesquelles les antibiotiques sont mélangés par le fabricant dans la poudre du ciment par des procédés brevetés (Tableau 2); et (b) des formulations libres, dans lesquelles l'antibiotique est mélangé à la main dans la poudre de ciment par le chirurgien, au cours d'une intervention. Pour les deux variantes, le chargement

d'antibiotiques peut être faible (0,5-1,0 g par 40 g de poudre) ou fort (2,0-4,0 g par 40 g de poudre) ⁴⁵.

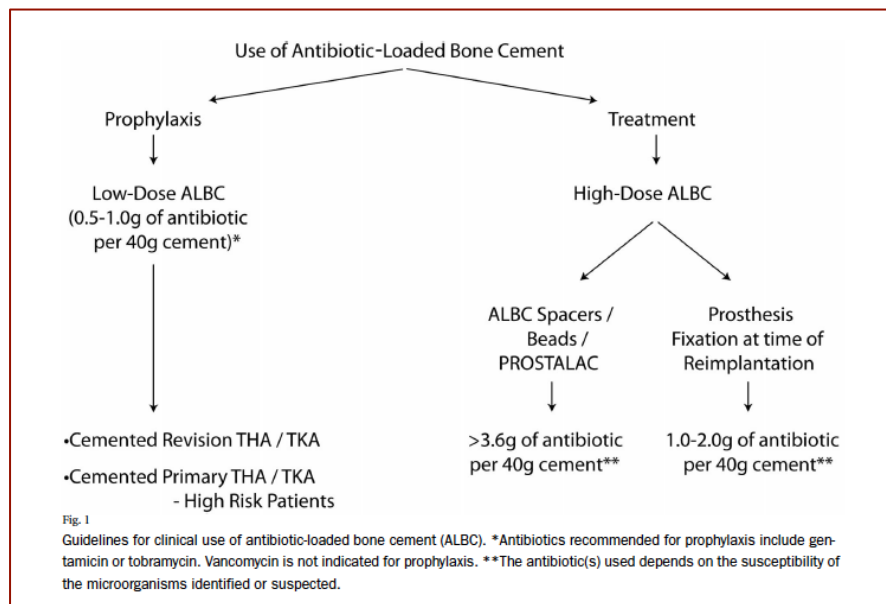


Figure 8: utilisation clinique de ciments chargés en antibiotiques
*JIRANEK et al 2006*⁴²

Le ciment que nous avons utilisé pour cette recherche est le CERAFIXGENTA® de la Société CERAVÉR (Roissy, France). Langlais *et al* ont évalué le relargage de la gentamicine chez 26 patients opérés de PTH cimentés avec PALACOS-Genta, ALLOFIX et CERAFIXGENTA®⁴⁶. Deux concentrations de gentamicine (0,6 et 1,2g) ont été étudiées dans le CERAFIXGENTA®. L'étude a révélé dans les liquides de drainage des taux d'antibiotiques bien supérieurs à la concentration minimum inhibitrice, avec un taux sanguin faible qui exclue le risque d'oto- ou de néphro-toxicité⁴⁶. La diffusion de la gentamicine est comparable dans le PALACOS-Genta et le CERAFIXGENTA® lorsque les concentrations initiales sont équivalentes⁴⁷; en effet l'étude montre que la concentration d'antibiotique libérée est dépendante de la concentration initiale d'antibiotique présente dans le ciment (Figure 9). Bunetel *et al* ont confirmé l'activité antibactérienne et l'absence de toxicité du ciment CERAFIXGENTA® comparé au PALACOS-Genta⁴⁸.

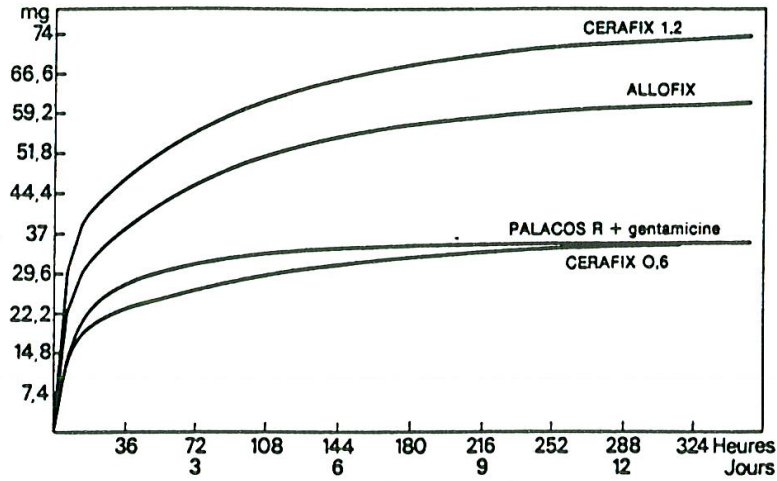


Figure 9 : Quantité globale d'antibiotique éliminée par 4 types de ciments à la gentamicine après chirurgie de PTH ; Langlais et al 1989⁴⁶

Par ailleurs, il a été montré que les propriétés mécaniques du CERAFIX® de base ne sont pas affectées par l'ajout de la gentamicine. L'implantation du CERAFIXGENTA® contenant 0,6 ou 1,2 gr de gentamicine a été étudiée dans un modèle de défaut osseux du fémur sur 17 moutons⁴⁹. La concentration gentamicine a été évaluée après 18 mois d'implantation du (Figure 10). L'étude a montré que la concentration osseuse de gentamicine restait élevée et supérieure à la concentration critique de 4mg/kg.

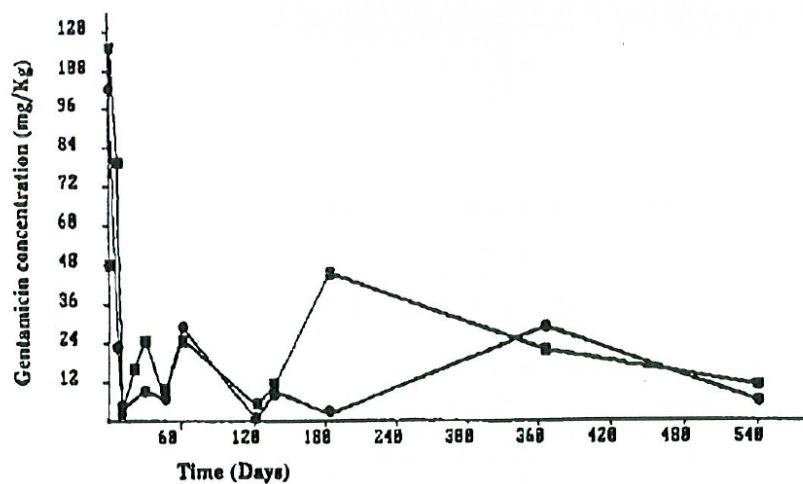


Figure 10 : Concentrations osseuses de gentamicine après implantation du CERAFIXGENTA® chez le mouton⁴⁹

Dans une méta-analyse des ciments imprégnés aux antibiotiques utilisés dans des PTH et PTG récentes, Wang J *et al*⁵⁰ comparent huit études incluant un échantillonnage de 6,381 arthroplasties. Les données combinées ont démontré que, par rapport au contrôle (ciment ordinaire ou antibiotique systémique), l'utilisation de ciment aux antibiotiques n'était pas corrélée à une diminution du taux d'infection superficielle (risque relatif [RR] = 1,47; IC 95%, 1,13 à 1,91; P = 0,004). Cependant cette méta-analyse a montré qu'il y avait des différences significatives dans le taux d'infection profonde entre le ciment aux antibiotiques et le groupe contrôle (RR = 0,41; IC à 95%, de 0,17 à 0,97; P = 0,04). Les auteurs ont aussi analysé des sous-groupes d'antibiotiques, de gentamicine et céfuroxime ; la gentamicine a été supérieure à la céfuroxime dans la réduction du taux d'infection profonde (P = 0,0005 contre P = 0,10). Cette méta-analyse a prouvé que l'utilisation prophylactique des ciments aux antibiotiques pourrait abaisser le taux d'infection profonde dans une arthroplastie totale primaire.

1.2.2.1. Risques liés à l'utilisation de ciments aux antibiotiques

Malgré une concentration locale d'antibiotique très élevée sur le site d'implantation, les concentrations sériques restent faibles aussi bien dans des modèles animaux⁴¹ qu'en clinique humaine⁵¹ conduisant à une absence de toxicité générale. Aucun risque allergique, toxique ou mécanique n'a été relevé avec l'utilisation de ciments imprégnés d'antibiotiques⁴². Cependant, il existe un risque de surdité et/ou d'insuffisance rénale pour les patients qui reçoivent à la fois un traitement local et par voie générale. Enfin, un problème majeur demeure quelle que soit la méthode prophylactique utilisée (locale ou par voie générale) : c'est l'émergence croissante de la résistance des bactéries aux antibiotiques. L'augmentation en France du nombre de souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes aux antibiotiques, est une conséquence de l'utilisation plus large de ces antibiotiques à but prophylactique ou thérapeutique.

Les échecs cliniques rapportés après traitement de prothèse infectée avec ciment imprégné d'antibiotiques sont souvent la conséquence d'un traitement global inadéquat et non spécialement à cause du ciment imbibé d'antibiotiques. Les complications tardives sont essentiellement mécaniques et représentent la cause principale des changements de prothèse.

Les éventuels problèmes sont :

-l'usure, qui est due aux frottements de la tête de la prothèse fémorale habituellement métallique à l'intérieur de la prothèse cotyloïdienne (en polyéthylène). Ce couple de frottement métal/polyéthylène reste le plus utilisé dans le monde (mais le couple céramique/céramique, en théorie inusable, permettrait de s'affranchir de ces complications). L'usure entraîne la libération de particules de polyéthylène. Ces particules sont responsables de réactions inflammatoires locales, qui peuvent générer des lésions osseuses lytiques et le descellement de l'implant.

-le descellement : provoque des micro-mouvements des pièces prothétiques qui ne sont plus fixées à l'os. Peu à peu cette micro-mobilité va entraîner l'apparition de douleurs et de boiterie, avec radiologiquement des pièces qui prennent du jeu et font apparaître un liseré qui témoigne du descellement. Celui-ci touche les deux pièces prothétiques ou une seule. Ces descellements sont provoqués d'abord par l'usure, qui entraîne des débris responsables de réactions inflammatoires qui provoquent une ostéolyse parfois très importante. Mais d'autres complications peuvent se voir comme les contraintes répétées, le vieillissement du ciment qui perd ses propriétés mécaniques, ou encore la différence d'élasticité entre l'os et les modules prothétiques.

1.3. Approches actuelles et futures pour la prévention et le traitement d'infections aux staphylocoques sur prothèses

Les stratégies actuelles visent à interrompre l'adhérence et l'accumulation des staphylocoques et de garder les bactéries dans la phase de croissance planctonique la moins virulente, afin de restaurer l'efficacité des antibiotiques et réduire le risque d'infection autour de l'implant. Le ciblage des premières étapes du développement du biofilm représente une stratégie prophylactique très intéressante. Le Tableau 3 résume différentes voies de recherche allant du ciblage immunitaire avec l'utilisation d'anticorps, les méthodes enzymatiques de disruption du biofilm et l'utilisation d'agents qui inhibent la formation de biofilm avec des composés qui bloquent la fixation initiale⁵².

Bien que la majorité des approches d'immunothérapie ciblent les infections aiguës et les bactéries dans un stade planctonique, l'utilisation de vaccins pour prévenir l'infection aux staphylocoques sur matériaux prothétiques est un domaine de recherche en évolution. Dans le

contexte des infections avec biofilms, deux cibles existent : les cellules bactériennes à l'intérieur du biofilm et la matrice de film biologique elle-même⁵³. La matrice du biofilm staphylococcique est composée de polysaccharides, protéines et/ou eDNA (DNA extracellulaire) selon les espèces et la souche. Le PNAG / PIA, polymère de surface produit à la fois par *S. aureus* et *S. epidermidis*, favorise la formation de biofilm. L'immunisation active ou passive avec le PNAG / PIA permet un effet protecteur contre l'infection de *S. aureus* dans un modèle d'infection rénale⁵⁴. Cependant seule une partie du PIA est immunogène et les réponses à cet antigène sont variables⁵⁵. Les protéines de surface de staphylocoques représentent aussi des cibles potentielles en raison de leur situation exposée et leur rôle dans la virulence. L'utilisation de domaines de liaison du facteur d'agglutination du fibrinogène (rClfA) recombinant a été démontrée comme partiellement efficace dans un modèle animal d'arthrite septique⁵⁶.

Les matériaux utilisés pour les dispositifs médicaux, dont la surface est pour la plupart chimiquement inerte, ont également été un domaine de recherche très développé. Une des conditions requises pour l'établissement d'une infection staphylococcique organisée en biofilm est l'adhérence des bactéries à la surface du polymère. Pour cette raison, plusieurs groupes de recherches ont focalisé leurs efforts dans la recherche des matériaux qui empêchent l'adhésion. Les stratégies de prévention de formation d'un biofilm comprennent la modification physico-chimique de la surface du biomatériau pour créer des surfaces anti-adhésives, l'incorporation d'agents antimicrobiens dans des polymères constitutifs des dispositifs médicaux, la conception des propriétés mécaniques alternatives et la libération des antibiotiques à partir de l'implant.

Therapeutic/Prophylactic Strategy	Mode of action
Immunisation	
PNAG/PIA	Target polysaccharide mediated biofilm
rClfA/rCLFB	Stimulates antibody production to the surface protein, clumping factor A and B
rIsdB	Vaccine versus conserved iron-sequestering protein in staphylococci
cna-FnBP	Fusion of <i>fnb</i> and <i>cna</i> to create recombinant protein to prevent staphylococcal biofilm adhesion.
SecC	Recombinant vaccine to surface exposed protein C in <i>S. epidermidis</i>
Attachment	
Charge modification	Hydrophilic negatively charged surfaces repel bacteria and prevent attachment.
Metals e.g. silver, copper	Prevent bacterial adhesion.
Hydrophilic polysaccharides/resins	Bind to biomaterial to create hydrophilic coating preventing attachment.
Enzymatic disruption	
Lysostaphin	Cleaves cross linking pentaglycine bridges, causing cell lysis
Dispersin B	Glycoside hydrolase enzyme, degrades PIA/PNAG
DNase I	Degrades cell surface-associated nucleic acids directly or indirectly
V8	Serine protease which cleave peptide bonds, such as glutamic acid, to disrupt protein mediated biofilm
Photodynamic treatment	
TBO	Generation of free radicals and cytotoxic reactive oxygen species
Chlorin (e6)	Generation of free radicals and cytotoxic reactive oxygen species
Antiseptics	
N-acetyl-L-cysteine (NAC)	Disrupts disulfide bonds and inhibits amino acid utilization.
Ethanol	Membrane disruption and protein denaturation.
Chlorohexidine	Destabilizes the bacterial cell wall and targets bacterial cytoplasm.
Chelators	
Apo-transferrin	Inhibits staphylococcal biofilm attachment to surfaces
EDTA	Chelator of metal ions with high affinity for magnesium
EGTA	Chelator of metal ions with high affinity for calcium
PGG	Chelates iron and enhances expression of iron-regulated genes
Quorum sensing targets	
AIP	Induces activation of agr system with increased levels of proteases and PSMs
PSMs	Surfactant properties to disrupt staphylococcal biofilm
Small molecules/Sortase inhibitors	
C2DA	Chemical messenger which signals prevention and dispersion of biofilm
Diarylacrylonitriles	Sortase inhibitor; inhibition of staphylococcal biofilm formation
Aryl ethyl ketones	Sortase inhibitor; inhibition of staphylococcal biofilm formation
Vinyl sulfones	Inhibition of sortaseA mediated linkage of fibronectin to the cell surface

Tableau 3 : Exemples de stratégies préventives et thérapeutiques pour le traitement d'infections sur prothèses dues aux staphylocoques, d'après Hogan et al 2015 ⁵²

La modification des polymères constitutifs du ciment est une voie de recherche innovante. L'inhibition de l'adhérence bactérienne *in vitro* par formation d'une couche hautement hydratée sur la surface du biomatériau a été décrite : le revêtement des biomatériaux par des molécules d'héparine a permis de diminuer l'adhérence de *S. epidermidis*⁵⁷. Les surfaces

hydrophiles et la présence de charges négatives sur le biomatériau montrent généralement moins d'adhérence bactérienne que les matériaux hydrophobes⁵⁸.

Des ciments acryliques modifiés avec du hydroxypropyl triméthylammonium chitosane [HACC] ont été étudiés dans un modèle de défaut osseux sur vingt-quatre lapins inoculés avec 10^7 CFU de *Staphylococcus epidermidis* résistantes à la méthicilline (Figure 11). Les ciments modifiés ont montré *in vivo* une forte activité antibactérienne envers des bactéries résistantes aux antibiotiques⁵⁹.

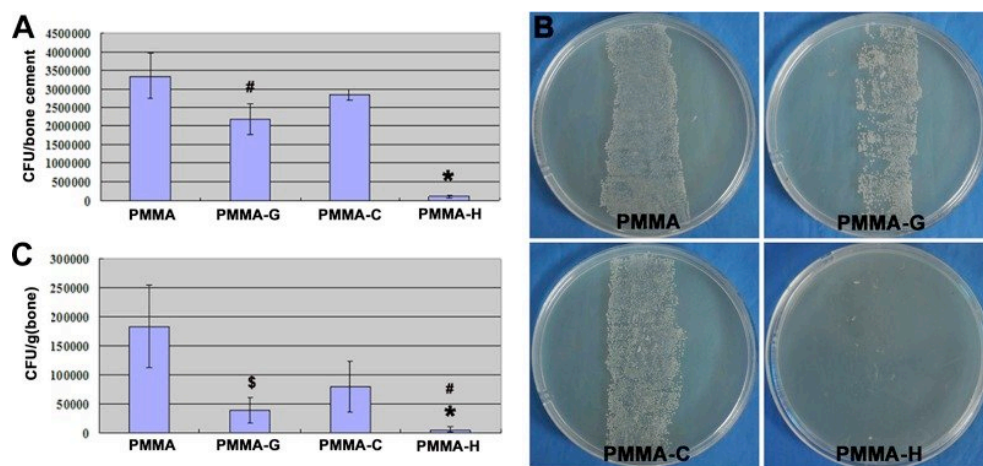


Figure 11 : Quantification de bactéries obtenues à partir des ciments explantés (A) CFU par échantillon explanté. *, $P < 0.01$, comparé avec les autres groupes; #, $P < 0.05$, comparé avec le PMMA et PMMA-C (chitosane). (B) Prolifération des bactéries sur gélose (C) Quantité de CFU/g os.

D'après Hong-lue Tan, 2014⁵⁹

Des études récentes montrent l'efficacité de l'inclusion dans les ciments acryliques des systèmes de libération nanométriques. Des ciments acryliques fonctionnalisés avec des nanoparticules de silice chargées d'antibiotiques peuvent libérer 8% d'antibiotiques dès 24h et augmenter l'efficacité de relargage jusqu'à 80 jours après l'implantation⁶⁰. Ces nanoparticules semblent se disposer dans le ciment comme des canaux nano-poreux permettant une amélioration de la diffusion de l'antibiotique sans pour autant compromettre les propriétés mécaniques du matériau.

Des nanoparticules lipidiques ont aussi été mises au point pour l'amélioration de la libération d'antibiotiques ou de toute autre molécule bactéricide à partir des ciments. L'inclusion dans le

ciment Palacos R des Liposomes chargées de gentamicine a été étudiée *in vitro*⁶¹. Ces ciments libèrent 22% d'antibiotique contre 9% lorsque l'antibiotique a été introduit sous forme de poudre, conduisant à une activité bactéricide importante et reproductible (Figure 12). L'inclusion des liposomes chargés d'antibiotiques dans le PMMA permettrait une libération progressive pendant 30 jours grâce à une amélioration de l'efficacité de diffusion sans compromettre les propriétés mécaniques du ciment ni l'agencement moléculaires des chaînes de polymère. Ce type de technologies pourrait permettre de diminuer les quantités d'antibiotiques introduites dans les ciments.

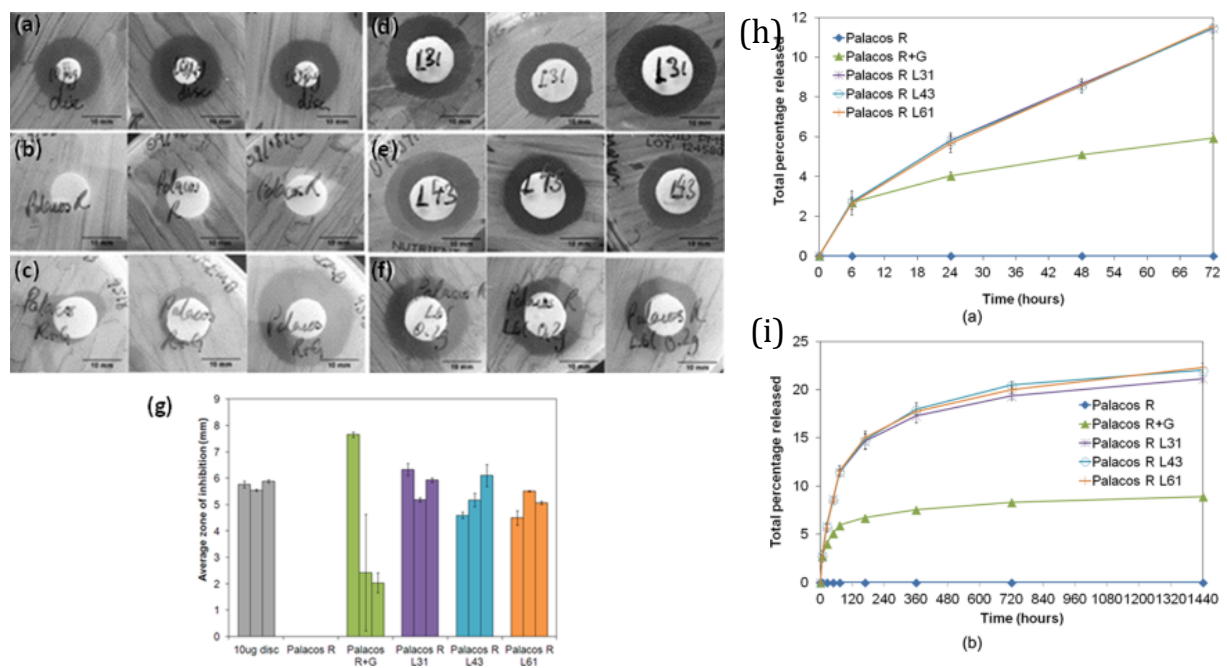


Figure 12 : Zones d'inhibition de *S. aureus*. Disques imprégnés avec 10 µg de gentamicine sensibilité (a), Palacos R seul pas d'activité antibactérienne (b). Palacos R+Genta montrant incohérences dans les zones of inhibition (c), Palacos R –Liposomes Genta montrant fortes zones d'inhibition (d–f). Quantification de l'inhibition (g). Courbes de libération de la gentamicine (h-i).

1.3.1. LES NOUVEAUX CIMENTS INHIBITEURS DE L'ADHERENCE

L'émergence de germes résistants aux antibiotiques demeure un problème important. C'est pourquoi depuis plusieurs années le laboratoire du Pr V Migonney développe un nouveau

type de ciments, non pas imprégnés d'antibiotiques, mais contenant des polymères porteurs sur leurs chaînes des groupements sulfonate (SO_3^-) et carboxylate (COO^-). Ces polymères sous forme de films ont montré des propriétés d'inhibition de l'adhérence de *Staphylococcus aureus in vitro* (Figure 13).

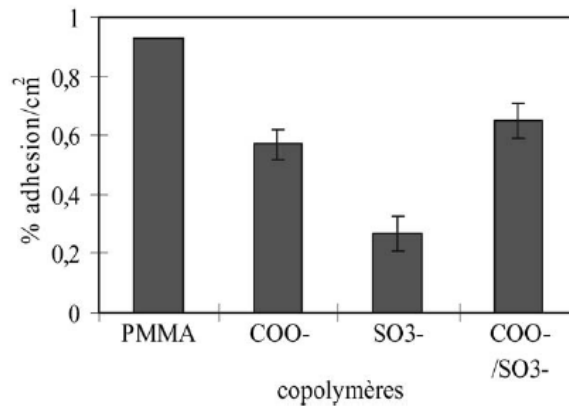


Figure 13 : adhérence de *S aureus* MRSA sur des polymères acryliques
*Pavon-Djavid et al 2005*⁶²

L'activité inhibitrice est dépendante de la composition chimique des polymères (Tableau 4) et liée aux protéines adsorbées à leur surface⁶³. En effet, les bactéries et en particulier les bactéries à Gram(+) impliquées dans les infections sur prothèse, se fixent sur les matériaux implantaires par l'intermédiaire de protéines d'adhérence comme la fibronectine⁶². Il a par ailleurs été constaté que sa conformation, lorsqu'elle s'adsorbe à la surface du matériau, varie en fonction de la proportion de groupements sulfonate et carboxylate.

refs	R = COO ⁻ / (SO ₃ ⁻ + COO ⁻)	% adherence / cm ²	std error	% inhibition / PMMA
PMMA		0.90	0.1	0
Z1	0.28	0.03	0.005	97
Z4	0.33	0.02	0.006	98
Z9	0.54	0.08	0.010	92
Z6	0.59	0.10	0.010	89
Z7	0.63	0.07	0.005	93
Z8	0.64	0.09	0.010	90
Z10	0.66	0.05	0.016	95
Z2	0.71	0.03	0.001	97
Z3	0.75	0.02	0.001	98
Z5	0.8	0.02	0.003	98
Z11	0.88	0.74	0.010	18

^a Standart error of the average of fours determinations.

Tableau 4: inhibition de l'adhérence bactérienne sur des copolymères acryliques
*Berlot et al 2002*⁶⁴

Ces polymères ont été greffés sur des prothèses articulaires en silicone et en Titane selon des méthodes développées au laboratoire. Des polymères portant des groupements sulfonate (SO_3) et carboxylate (COO^-) ont été greffés aux prothèses et étudiés dans un modèle infectieux de remplacement partiel du genou avec un composant tibial. Les résultats ont montré une diminution de l'infection chez le lapin après 24h⁶⁵ (Figure 14).

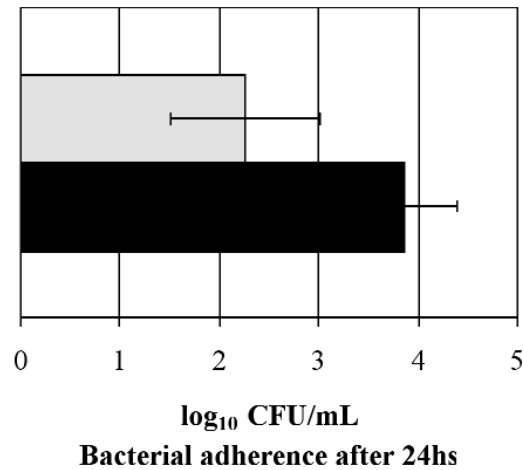


Figure 14 : Inhibition de l'infection sur prothèse in vivo chez le lapin
Crémieux et al 2003⁶⁵

Une inhibition comparable a été observée lorsque des *Staphylococcus aureus* résistantes aux betalactamines ont été évalués par la même méthode.

Il existe sur le marché de nombreux types de prothèses et de ciments, avec des structures et compositions variées, mais malgré tous les efforts apportés à la conception des ces matériaux, l'infection demeure un problème majeur. C'est dans ce contexte et sur la base des résultats antérieurs encourageants sur les polymères acryliques, que mon projet de recherche a été conçu. L'objectif de ce projet est la mise au point de ciments modifiés, inhibiteurs de l'adhérence de bactéries, basés dans l'inclusion de polymères porteurs des groupes NaSS dans la formulation des ciments acryliques CERAFIX® et CERAFIXGENTA®.

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Production des échantillons de mélanges CERAFIX® /polyNaSS

2.1.1. LA PREPARATION DES ECHANTILLONS DE CIMENT

Ciments sans NaSS : Le ciment de base utilisé pour les analyses est le CERAFIX® (CEREVER-Roissy-France). Le produit est obtenu (comme indiqué dans la fiche technique) par mélange de la poudre de PMMA (45,55g de poudre CERAFIX®) avec le liquide contenant l'amorceur (ampoule de 21mL de liquide CERAFIX®).

Ciments avec NaSS : Le produit est obtenu par mélange de la poudre de PMMA (45,55g de poudre CERAFIX®) avec le liquide contenant l'amorceur (ampoule de 21 mL de liquide CERAFIX®) et 1,331g de NaSS (2% masse totale) ou 3,275g de NaSS (5% masse totale).

Lorsque le mélange est bien homogène et liquide le produit est introduit dans un moule pour former des disques de PMMA de diamètre 1,4cm et de hauteur 0,5cm. Après polymérisation et séchage les disques de ciments sont récupérés et lavés dans plusieurs bains. Tous les échantillons de PMMA (avec et sans polyNaSS) subissent plusieurs lavages (au moins 3) dans des solutions de NaCl 1,5M et 0,15M :

- 3x3 h dans du NaCl à 1.5M
- 3x3 h dans du NaCl à 0.15M
- 3 h dans de l'eau distillée
- 1 h dans du PBS.

2.1.2. CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS

A la fin des lavages, les disques sont stérilisés sous UV (15 min chaque face) puis conservés dans du PBS stérile à +4°C. Lors des mesures d'adhérence bactérienne, une première série de manipulations a été réalisée avec des échantillons préalablement incubés avec des solutions d'albumine à 0.4mg/mL puis avec des solutions de fibrinogène (protéine de liaison) à

300µg/mL à 37°C. Lors d'une deuxième série de mesures d'adhérence bactérienne, les échantillons ont été préalablement incubés avec du plasma à 37°C.

2.1.3. ANALYSES CHIMIQUES DE L'ETAT DE SURFACE DES MELANGES CIMENT/POLYMERE

Pour chaque mélange CERAFIX®/polyNaSS et ciment/copolymère, plusieurs mesures ont été réalisées :

Mesure de l'angle de contact : cette méthode permet de caractériser l'interaction entre un liquide et le mélange solide ciment/polymère et donc de déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface testée. L'angle de contact a été mesuré après mise en place de 2 µl d'eau sur la surface du mélange ciment/polymère.

Mesure de la cinétique de relargage des polymères introduits dans le ciment : Pour chaque mesure, 12 échantillons de 0,5g en moyenne ont été conservés dans 20mL de PBS pour permettre l'analyse dans les seuils de sensibilité de la méthode. La quantité de polymères relargués a été mesurée par une réaction colorimétrique en fonction du temps.

2.2. Adsorption de l'albumine et de protéines plasmatiques sur les échantillons de CERAFIX® avec et sans polyNass

La quantification de protéines s'effectue par une méthode colorimétrique. Une gamme d'étalonnage est réalisée avec des solutions d'albumine de concentration connue selon le schéma suivant :

	Volume ajouté (mL)										
[BSA] mg/mL	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
V(BSA) (4mg/mL)	0	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250
V(Tampon)	2000	1975	1950	1925	1900	1875	1850	1825	1800	1775	1750



La gamme d'étalonnage est réalisée à chaque expérience permet de quantifier l'albumine en solution. Le dosage a été effectué à l'aide du kit BCA BioRad. Afin d'évaluer l'adsorption sur les ciments, des

solutions d'albumine et des protéines plasmatiques de concentration connue sont incubées avec des échantillons en ciment dans une boîte 24 puits pendant 1h à 37°C sous agitation.

Deux types de mesures sont pratiqués :

-le dosage dans le surnageant permettant d'observer la différence entre la concentration initiale incubée et la concentration finale restant après adsorption.

- la désorption de protéines adsorbées à l'aide d'un tampon d'extraction. Une fois que les protéines sont adsorbées à la surface du ciment, on entame le protocole de désorption :

- ✪ Laver les ciments avec de l'eau distillée par pipetages successifs
- ✪ Ajouter 800µL de tampon d'extraction
- ✪ Incuber 1h à 60°C sous agitation
- ✪ Dans une plaque 96 puits :
 - Prélever 25µL de chaque tube de gamme en duplicata
 - Prélever 25µL de chaque suspension de tampon (puits contenant les ciments)
 - Ajouter 200µL de réactif A+B
 - Incuber 30 min à 37°C
 - Le zéro d'absorbance est représenté par 225µL de tampon d'extraction seul
 - Lecture de l'absorbance à 562nm

2.3. Culture de *Staphylococcus aureus*

2.3.1. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE LIQUIDE

La culture en milieu liquide est réalisée dans le Bouillon Mueller Hinton (BMH Sanofi Diagnostics Pasteur). Le milieu est préparé comme suit : 22g BMH du milieu en poudre sont dissous dans 1000mL d'eau distillée et portés à ébullition sous agitation continue. Le bouillon est ensuite stérilisé à l'autoclave puis conservé stérilement à 4°C.

2.3.2. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE SEMI SOLIDE (GELOSES)

38g de poudre de gélose Mueller Hinton Agar II (MHAI Sanofi Diagnostics Pasteur) sont dissous dans 100mL d'eau distillée et portés à ébullition sous agitation continue. Le mélange est stérilisé à l'autoclave, puis avant le refroidissement de la solution, on verse le milieu dans

des boîtes de Pétri stériles. Les boîtes sont ensuite placées une nuit à l'incubateur à 37°C puis conservées dans du papier aluminium au réfrigérateur.

2.3.3. MESURE DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE PAR TURBIDIMETRIE

Centrifuger une culture overnight à 3500rpm pendant 15minutes. Resuspendre avec du bouillon de culture MH et agiter fortement avec un vortex. Puis préparer des dilutions de la suspension bactérienne : 3/4 ; 1/2; 1/4; 1/10. Mesurer l'absorbance des suspensions bactériennes pour 1mL à 600 nm. Faire le blanc d'absorbance avec le bouillon de culture. En parallèle étaler sur gélose en triplicata 50µL des suspensions diluées. Placer les boîtes de gélose à l'incubateur une nuit à 37°C. Le lendemain, compter les colonies et faire une courbe d'étalonnage : absorbance vs nombre CFU/mL.

2.3.4. PROLIFERATION BACTERIENNE EN MILIEU LIQUIDE

Une à deux colonies bactériennes sont inoculées dans 5mL de milieu de culture MH (bouillon) puis incubées une nuit à 37°C. La culture « overnight » est centrifugée à 3500rpm pendant 15minutes puis resuspendue dans du bouillon MH. Après agitation forte, l'absorbance de la suspension bactérienne est mesurée à 600 nm. Des dilutions de la suspension bactérienne sont est préparées (avec une absorbance à t=0 de 0,1). Les suspensions sont incubées à 37°C et l'absorbance est mesurée toutes les 30 minutes. Une courbe d'absorbance en fonction du temps est établie.

2.4. Evaluation de l'adhérence bactérienne sur les ciments

Une à deux colonies bactériennes sont inoculées dans 5mL de milieu de culture MH (bouillon) puis incubées une nuit à 37°C. La culture « overnight » est centrifugée à 3500rpm pendant 15minutes puis resuspendue dans 1mL de NaCl à 0,15M. Après agitation forte, l'absorbance de la suspension bactérienne est mesurée à 600 nm.

Préparation de la solution mère :

-Agiter au vortex et prélever 160µL de la suspension bactérienne que l'on introduit dans 1mL de milieu MH (bouillon).

-Incuber 3h à 37°C puis centrifuger à 3500rpm pendant 15min. Resuspendre dans 19mL de PBS.

-Evaluer le nombre de bactéries par mesure de l'absorbance. Diluer la solution bactérienne afin d'obtenir une suspension à 5.10^6 bactéries/mL. Cette solution diluée est la solution mère. 1mL de cette solution est introduit dans chaque puits contenant des disques de ciments acryliques préalablement absorbées de protéines.

Chaque dilution de solution bactérienne a été testée sur 3 échantillons de CERAFIX® seul et 3 échantillons de CERAFIX®/polyNaSS (ou copolymère). La mesure du nombre de bactéries adhérees a été réalisée 3 fois pour chaque échantillon et une moyenne a été calculée pour chaque échantillon. L'effet sur l'adhérence du *S. aureus* à la surface du ciment est mesuré en comparant, à nombre de CFU incubées identiques, le nombre de CFU adhérees sur le CERAFIX® seul et sur le CERAFIX®/polyNaSS.

Les mesures d'adhérence bactérienne ont été réalisées avec des dilutions à $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{8}$ de cette solution bactérienne selon le protocole suivant:

-Placer dans une plaque de 24 puits les disques de ciments

-Ajouter 1mL de PBS/albumine à 0,4g/L dans chaque puits et incuber 30minutes à 37°C sous agitation. Laver deux fois au PBS. (Cette étape n'est pas nécessaire si on incube avec plasma.)

-Ajouter 1mL de la solution protéique (Fg à 300µg/mL ou plasma) dans les puits et incuber pendant une heure à 37°C sous agitation. Laver trois fois au PBS/albumine à 0,4g/L.

-Ajouter 1mL de solution bactérienne et incuber pendant une heure à 37°C sous agitation. Laver trois fois au PBS.

-Ajouter 1mL d'une solution de trypsine à 200µg/mL pendant 15 minutes à 37°C. Récupérer la solution de trypsine et laver avec 1mL de PBS (garder aussi la solution de lavage) puis étaler les bactéries sur gélose pour comptage.

2.5. Interactions ostéoblastes/ ciments

2.5.1. CULTURE D'OSTEOBLASTES

Les cellules MC3T3 (ATCC® CRL-2593™) ont été utilisées pour cette étude. Afin de conserver les cellules dans un environnement favorable, celles-ci sont cultivées dans un milieu de culture complet dans des boîtes de 75 cm² de surface ou des plaques de culture. Le

milieu de culture complet est constitué de DMEM (Gibco) contenant 10% de SVF, 1% d'ATB, 1% de L-Glutamine (Gibco). La culture est maintenue à 37°C, sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

2.5.2. VIABILITE DES OSTEOBLASTES

La viabilité des ostéoblastes est déterminée par la coloration du Rouge Neutre. Les cellules sontensemencées à raison de 50 000 cellules/puits au contact des différents polymères.

Sont préparés, un témoin négatif représentant la suspension cellulaire à laquelle est ajouté 10% de DMSO, et un témoin positif correspondant au fond de puits, c'est-à-dire la suspension cellulaire seule. Ces témoins permettront de donner respectivement l'échelle de 0% à 100% de viabilité.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, 50 µL de solution de Rouge Neutre (Neutral Red, *Sigma*) sont introduits dans chaque puits et la plaque est à nouveau incubée à 37°C pendant 90 minutes.

Le rouge neutre pénètre dans les cellules sans pouvoir ressortir si celles-ci sont vivantes. Au contraire, si les cellules sont mortes, le rouge neutre ne restera pas dans les cellules et sera alors éliminé lors du rinçage. De cette façon, ne sera mesurée que l'absorbance correspondante à la quantité de rouge neutre pénétrée dans les cellules vivantes.

Après 90 minutes d'incubation, le surnageant contenant l'excès de rouge neutre et les cellules non adhérentes est aspiré, et un rinçage au PBS est effectué. Les cellules adhérentes sont lysées pendant 15 minutes par un tampon (50% d'éthanol, 49% d'eau, 1% d'acide acétique) à raison de 1 mL de tampon par puits. L'absorbance est ensuite mesurée à 550 nm pour chaque puits par un spectrofluorimètre (*Xenius Spectrometer*).

2.5.3. MORPHOLOGIE DES OSTEOBLASTES

Deux types d'évaluations ont été réalisées : marquage fluorescent et observation MEB.

Pour le marquage en fluorescence, les expériences ont été réalisées après 24h. Les cellules sont marquées par une solution de Phalloïdine rouge (Molecular Probes) qui se fixe aux filaments d'actine présents dans le cytoplasme des cellules. Une coloration simultanée au DAPI (coloration nucléaire) permet de repérer les cellules.

Le protocole utilisé est le suivant :

Les puits sont lavés deux fois au PBS, puis les cellules sont fixées par du formaldéhyde à 4% dans du PBS. Les puits sont ensuite lavés avec du PBS-BSA à 0,4%, et une perméabilisation des cellules est réalisée par du Triton x100 à 0,1% dans du PBS pendant 5 minutes à température ambiante. Après élimination du surnageant, un blocage est effectué par du PBS-BSA à 3% pendant 30 minutes à température ambiante, et les puits sont ensuite lavés au PBS-BSA à 0,4%.

Enfin, 200 μ L de solution de Phalloïdine rouge et de DAPI sont ajoutés dans chaque puits et les plaques sont laissées 30 minutes à température ambiante. Pour permettre l'observation au microscope à fluorescence, les puits sont une nouvelle fois lavées au PBS-BSA à 0,4%.

2.5.4. PROLIFERATION DES OSTEOBLASTES

Afin d'établir les cinétiques de prolifération, une plaque de 24 puits par polymère étudié estensemencée (50 000 cellules/puits) et incubée à 37°C. Trois puits par polymère et par jour d'incubation sont détachés et le nombre de cellules est compté.

Les cellules proliférant sur les surfaces des ciments sont détachées avec une solution de Trypsine à 37°C. Le comptage cellulaire s'effectue dans un compteur de particules (Coulter Counter ZM *Beckman Coulter*) avec 10mL d'électrolyte (Isoton Coulter).

2.6. Analyse statistique

Les résultats ont été analysés avec des analyses ANOVA avec des tests post Hoc type Tuckey des comparaisons multiples. Les différences sont considérées significatives à $p < 0.05$.

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3. RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1 : Mélanges CERAFIX® et CERAFIXGENTA® avec le PolyNaSS

3.1. Production des mélanges de poly(styrène sulfonate de sodium) polyNaSS/ciments

Les objectifs de la première partie de cette recherche ont été d'évaluer la faisabilité de la préparation de mélanges de ciments commerciaux avec le poly(styrène sulfonate de sodium) à différents pourcentages et d'évaluer l'intérêt de ces mélanges dans l'inhibition de l'adhérence d'une souche bactérienne clinique de *Staphylococcus aureus*, résistante à la méthycilline.

Deux types de ciments ont été utilisés :

- Le ciment de base utilisé pour les analyses est le CERAFIX® (CERAVÉR-Roissy-France)
- Le même ciment imprégné d'antibiotiques CERAFIXGENTA® (CERAVÉR-Roissy-France) a été utilisé dans les expériences de bactériologie afin de comparer les effets sur l'adhérence bactérienne.

Des mélanges de CERAFIX®/polyNaSS ont été réalisés dans 3 proportions différentes : à 2%, 5% et 10% de polyNaSS dans le ciment. La préparation des mélanges ciment (poudre constituée de PMMA)/polyNaSS a été réalisée dans des moules en Téflon®, matériau inerte permettant d'obtenir des disques de PMMA d'épaisseur et de diamètre contrôlé et identique. La proportion de polyNaSS mélangé à la poudre du ciment a été calculée par rapport au poids total de ciment (polymère + monomère).

Après mélange manuel du polyNaSS et de la poudre de ciment, le monomère est ajouté et mélangé jusqu'à obtention d'une pâte macroscopiquement homogène qui est versée dans les moules. La vérification macroscopique de l'état de surface de tous les échantillons a été réalisée (Figure 15). Les échantillons présentant des anomalies manifestes (bulles d'air, irrégularité, disque incomplet) ont été éliminés de l'étude.

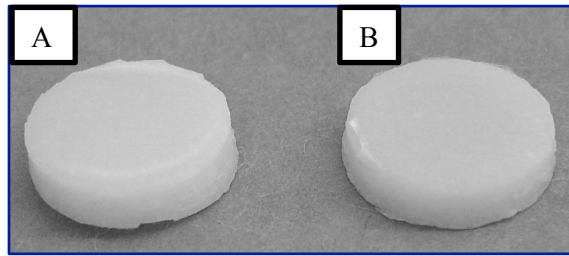


Figure 15: image des échantillons de ciment CERAFIX® (A) et de CERAFIX®/polyNaSS (B)

Le mélange de la poudre du ciment contenant 20% du polyNaSS avec le monomère est plus difficile et conduit à l'obtention d'un échantillon d'aspect « sableux » et un allongement de la durée de la réaction de polymérisation. La manipulation d'un mélange contenant 10% du polyNaSS ou à des proportions inférieures n'entraîne pas de modification visible par rapport au PMMA sans polyNaSS.

3.1.1. ETUDE DU RELARGAGE DE POLYNaSS PAR LE MELANGE CERAFIX®/POLYNaSS

La libération de polyNaSS à partir des échantillons CERAFIX®/polyNaSS a été étudiée dans la solution de conservation des échantillons ; il s'agit du tampon PBS (tampon phosphate) permettant le maintien du pH à 7,4 et une salinité isotonique par rapport aux cellules. Le PBS utilisé pour la préparation d'échantillons est stérile.

Le relargage de polyNaSS à partir de l'échantillon n'a pu être mis en évidence que pour les échantillons de mélange CERAFIX®/polyNaSS à 10%. Pour les échantillons à 2% et 5% en polyNaSS, les quantités libérées dans la solution de conservation étaient trop faibles pour être détectées par la méthode utilisée. Néanmoins, ce relargage semble entraîner des modifications architecturales du ciment avec augmentation de la porosité.

3.2. Adsorption d'albumine sur le mélange ciment CERAFIX®/polyNaSS

L'adsorption de l'albumine sur les ciments permet de déterminer quelle est la surface réelle du matériau accessible aux protéines. Des solutions d'albumine de concentration connue (C_i) sont incubées avec des échantillons en ciment pendant une heure, la quantité adsorbée est déterminée (C_{ads}) et portée en fonction de C_i (exemple dans Figure 16).

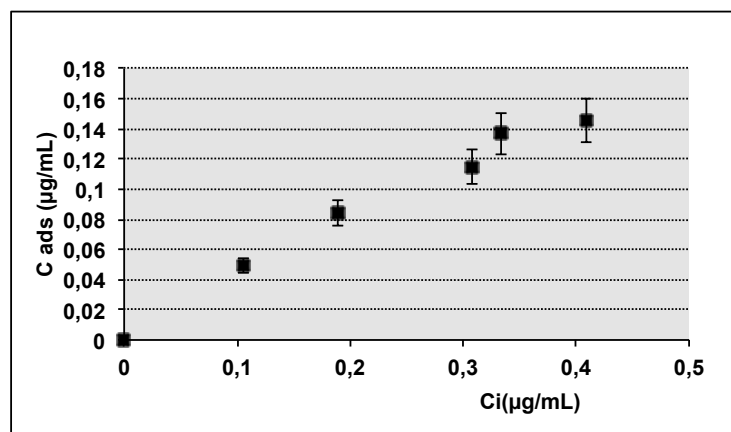


Figure 16 : absorption d'albumine sur les surfaces de ciment

La quantification de la quantité maximale d'albumine fixée par cm^2 de ciment (concentration de saturation d'albumine), permet de déduire la surface réelle de l'échantillon par rapport à une surface considérée comme de référence. Il a été montré précédemment que sur une surface parfaitement lisse et régulière, la quantité saturante d'albumine adsorbée est de $0.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ^{63, 64}

Nous avons pu ainsi déterminer les surfaces réellement accessibles aux protéines dans le CERAFIX® et les mélanges CERAFIX®/polyNaSS (Tableau 5).

Ciment	Surface réelle calculée/surface géométrique
CERAFIX®	116
CERAFIX®/polyNaSS 2%	208
CERAFIX®/polyNaSS 5%	324
CERAFIX®/polyNaSS 10%	648

Tableau 5 : détermination des surfaces réelles accessibles aux protéines sur des ciments

La surface réelle du ciment contrôle CERAFIX® est 116 fois plus importante que sa surface géométrique. Les différences sont encore plus importantes dans les mélanges comme il est montré dans le Tableau 5. L'augmentation de la surface réelle est fonction de la teneur en polyNaSS dans le ciment. Les mélanges à 2, 5 et 10% de polyNaSS montrent des surfaces réelles respectivement 208, 324 et 648 fois plus importantes que la surface géométrique. Cette

différence importante entre la surface réelle et la surface géométrique des échantillons peut s'expliquer par la porosité augmentée des échantillons lors du mélange avec le polyNaSS. Cette porosité pourrait résulter de la formation de bulles d'air lors de la fabrication des échantillons mais aussi être la conséquence du relargage des polymères, laissant des espaces et donc offrant une plus grande surface d'adhérence.

3.3. Adhérence bactérienne sur des échantillons de ciments et de mélanges CERAFIX®/polyNaSS:

Lorsqu'un implant est mis en contact avec les tissus, le premier événement qui survient très rapidement est l'adsorption des protéines à la surface du matériau. Il s'agit des protéines présentes dans le plasma qui vont s'adsorber en fonction de leur affinité pour la surface. Ces protéines agissent comme médiateurs de l'attachement aussi bien des cellules des tissus environnants que des bactéries pathogènes, en particulier les Gram(+).

Une protéine très souvent impliquée dans l'adhérence des staphylocoques est le fibrinogène, c'est pour cette raison que les expériences ont été réalisées tout d'abord sur des surfaces preadsorbées de fibrinogène. L'intérêt de travailler dans un milieu protéique pur – une seule protéine – est de garantir la mise en évidence d'un effet inhibiteur. En effet, dans ce cas il n'y a pas de compétition avec les autres protéines présentes dans le plasma, la présence de cette seule protéine d'adhésion amplifie la réponse de l'inhibition de l'adhérence bactérienne. Dans une seconde étape, plus représentative des conditions physiologiques « *in vivo* » le fibrinogène a été remplacé par le plasma (mélange protéique) et la compétition entre les protéines pour s'adsorber sur la surface étudiée peut avoir lieu.

Le micro-organisme testé est un *Staphylococcus aureus* dont la souche est connue au laboratoire (souche clinique MRSA fournie par le Pr Anne-Claude Crémieux). La mesure d'adhérence a été réalisée en phase de croissance exponentielle bactérienne, phase au cours de laquelle la bactérie exprime les adhésines, il s'agit de récepteurs membranaires impliqués dans l'attachement de la bactérie aux surfaces par l'intermédiaire des protéines de liaison. L'adhérence bactérienne a été étudiée simultanément sur des échantillons de CERAFIX® (PMMA seul, contrôle) et sur des échantillons de mélange CERAFIX®/polyNaSS.

3.3.1. ADHERENCE DE *S AUREUS* SUR DES SURFACES PREADSORBEES DE FIBRINOGENE

Pour évaluer l'adhérence des bactéries sur la surface des ciments, des suspensions bactériennes sont incubées avec les surfaces à étudier. Après mesure du nombre de bactéries/mL de la solution bactérienne initiale, une dilution était effectuée afin d'obtenir une solution bactérienne avec environ 5.10^6 bactéries/mL. Les expérimentations avec les bactéries sont souvent très délicates et les paramètres mis en jeux pour l'analyse de l'adhérence très nombreux et hétérogènes, ce qui conduit à des résultats aléatoires. C'est pour cette raison que les expériences sont multipliées (réalisées au minimum 3 fois) et que pour chaque expérience, trois dilutions de la suspension bactérienne sont incubées pendant une heure, enfin chaque point est effectué en triplicata. L'adhérence de bactéries sur le CERAFIX® et l'adhérence sur le CERAFIX®/polyNaSS sont réalisées en parallèle. Les Figures 17 et 18 présentent les résultats obtenus pour une expérience à titre d'exemple. Le nombre de bactéries adhérees après incubation sur le ciment pré-adsorbé de fibrinogène est porté en fonction du nombre de bactéries initial (Figure 17 et 18). Une régression linéaire est réalisée et la pente de la droite représente l'adhérence des bactéries sur les surfaces étudiées selon la méthode décrite dans des travaux précédents^{63, 64}. Les pentes des droites de régression linéaire (0,3435 dans la Figure 13 et 0,2175 dans la Figure 14) exprimées en pourcentage représentent l'adhérence.

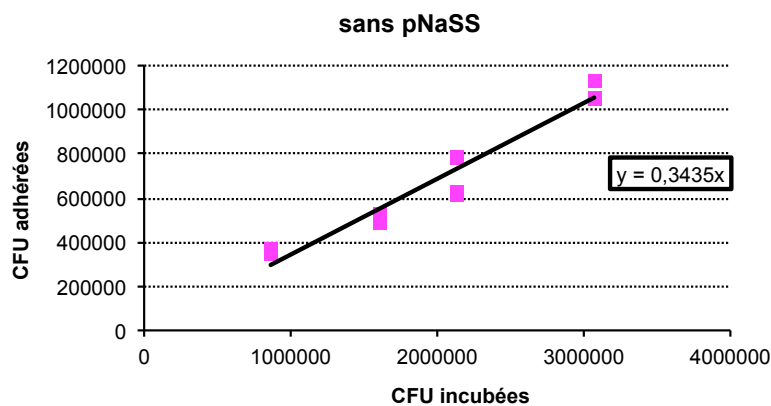


Figure 17 : Adhérence de *S aureus* sur des surfaces en CERAFIX®. Nombre de CFU adhérees en fonction du nombre de CFU incubées.

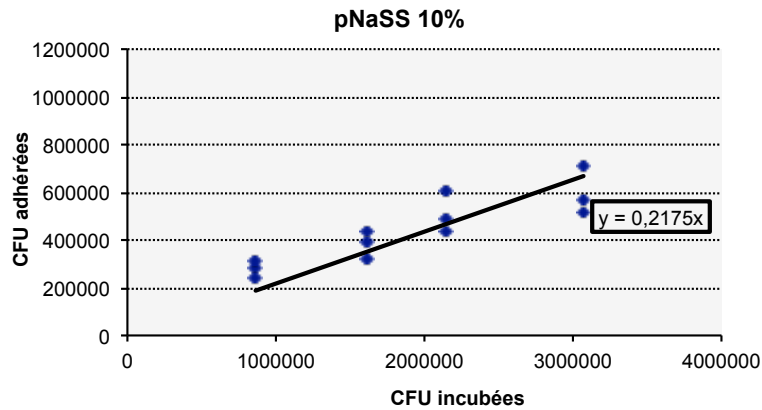


Figure 18 : Adhérence de *S aureus* sur des surfaces en CERAFIX® avec 10% de polyNaSS. Nombre de CFU adhérees en fonction du nombre de CFU incubées.

Les expériences sont répétées trois fois pour chacun des mélanges CERAFIX®/polyNaSS. Le Tableau 4 résume les données obtenues. Les colonnes appelées « sans NaSS et avec NaSS » représentent l’adhérence sur le CERAFIX® et sur le CERAFIX®/polyNaSS respectivement. La colonne « Diminution de l’adhérence % » (Tableau 6) montre la différence des pentes entre les deux droites de régression, celle de CERAFIX®/polyNaSS et celle du contrôle CERAFIX® réalisée en parallèle avec la même suspension de bactéries. La colonne « Moyenne » (Tableau 6) représente la moyenne de la diminution de l’adhérence % calculée.

% NaSS ajouté au CERAFIX®	sans pNaSS	avec pNaSS	Diminution adhérence %	Moyenne	SD
2	0.118	0.098	16.9		
2	0.212	0.166	21.7	19.3	3.36
5	0.127	0.098	22.8		
5	0.171	0.118	31.0		
5	0.302	0.227	24.8	26.2	4.25
10	0.011	0.008	27.3		
10	0.068	0.036	47.1		
10	0.343	0.217	36.7	37.0	9.90

Tableau 6: adhérence de *S aureus* sur des échantillons de ciment CERAFIX® avec du polyNaSS ; les surfaces ont été pré-incubées avec du fibrinogène.

On observe une variation importante des pentes pour un même pourcentage de mélange ainsi que pour les contrôles (Tableau 6). Il s'agit des expériences différentes avec des légères variations dans le nombre initial de bactéries incubés, ce qui entraîne une variation dans le nombre de bactéries adhérees. C'est un point bien connu dans les expériences d'adhérence bactérienne et c'est la raison pour laquelle une courbe contrôle doit être obligatoirement réalisée en parallèle. Pour cette raison il n'est pas possible d'effectuer des moyennes entre tous les contrôles. Néanmoins, il est clairement observable une diminution de l'adhérence de *S aureus* avec la présence de polyNaSS dans le ciment. L'adhérence bactérienne sur le CERAFIX®/polyNaSS est diminuée de 19 à 37% par rapport à l'adhérence sur le PMMA présent dans le CERAFIX® contrôle dans les mêmes conditions expérimentales (Tableau 6).

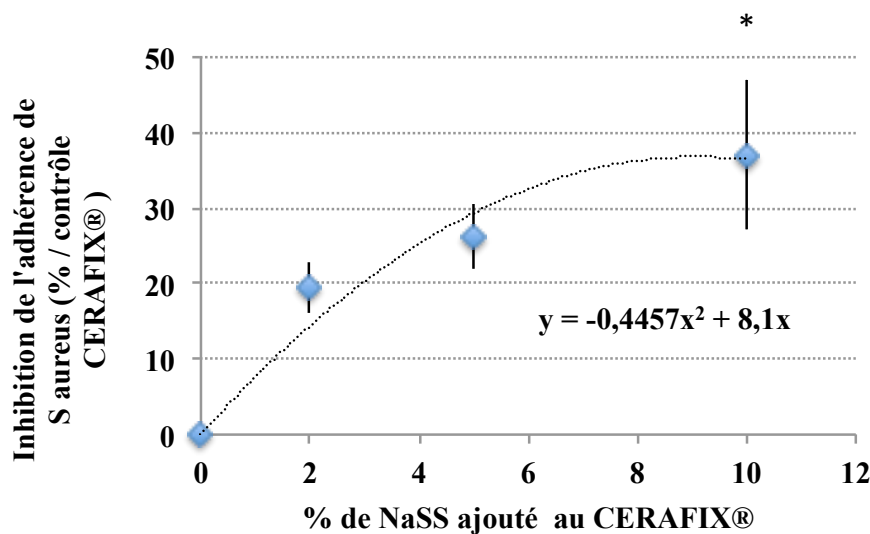


Figure 19: Inhibition de l'adhérence de *S aureus* par CERAFIX®/polyNaSS (pré-incubation avec une solution de fibrinogène)*différence significative $p < 0,05$

L'effet du polyNaSS est lié à la proportion de polyNaSS présent dans le CERAFIX® (Figure 19). On observa que lorsque les surfaces sont pré-incubées avec des solutions de fibrinogène, la présence du polyNaSS à 2, 5 et 10% dans le mélange entraîne une diminution significative ($p < 0,05$ par rapport au contrôle) de l'adhérence du *Staphylococcus aureus*. La relation entre la proportion de polyNaSS dans le mélange CERAFIX®/polyNaSS et l'effet sur l'adhérence bactérienne suit un modèle polynomiale de deuxième degré. Alors que la concentration du polyNaSS est faible, l'effet sur l'adhérence bactérienne est déjà présent (à 2%, la diminution de l'adhérence du *S. aureus* est de $19 \pm 3,3\%$), à plus forte concentration l'inhibition semble rester sur un plateau vers 35-40% inhibition. Néanmoins, en raison de la difficulté à obtenir

un produit homogène au delà d'une certaine quantité de polyNaSS, il n'a pas été possible d'évaluer l'effet de plus fortes concentrations de polyNaSS dans le mélange.

3.3.2. ADHERENCE DE *S AUREUS* SUR DES SURFACES PREADSORBEES DU PLASMA

Lorsque les surfaces ont été pré-incubées avec les protéines du plasma, le polyNaSS présent dans le mélange CERAFIX®/polyNaSS entraîne également une diminution significative de l'adhérence du *Staphylococcus aureus* dans les trois types de mélanges étudiées (à 2, 5 et 10%). L'adhérence bactérienne est diminuée de 17 à 31% par rapport à l'adhérence sur le PMMA du CERAFIX® seul dans les mêmes conditions expérimentales (Tableau 7 et Figure 20).

% NaSS ajouté au CERAFIX®	sans pNaSS	avec pNaSS	Diminution adhérence %	Moyenne	SD
2	0.17	0.15	15		
2	0.23	0.19	20		
2	0.20	0.16	18	17	2.5
5	0.15	0.11	28		
5	0.12	0.09	22		
5	0.26	0.21	21	23	3.8
10	0.11	0.08	26		
10	0.28	0.19	31		
10	0.171	0.108	37	31	5.6

Tableau 7: adhérence de *S aureus* sur des échantillons de ciment CERAFIX® avec du polyNaSS ; les surfaces ont été pré-incubées avec des protéines plasmatiques.

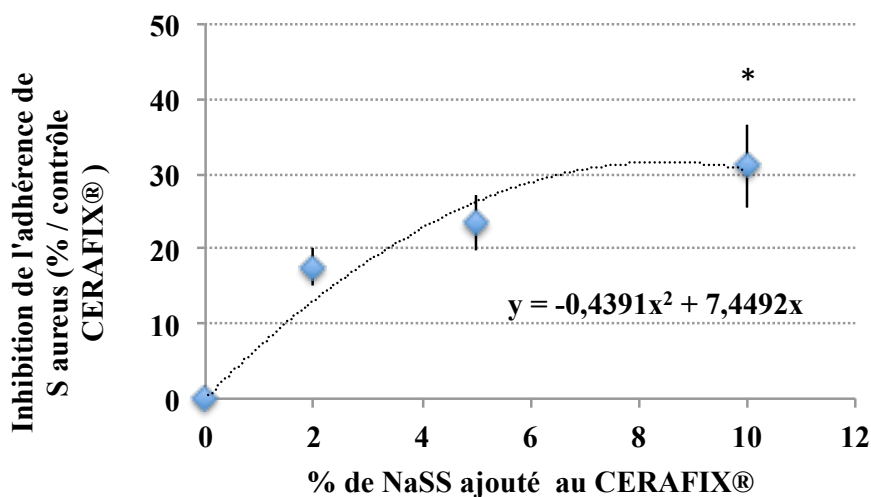


Figure 20: Inhibition de l'adhérence de *S. aureus* par CERAFIX®/polyNaSS (pré-incubation avec du plasma) *différence significative $p < 0,05$

L'effet d'inhibition est légèrement moins important que dans le cas de la adsorption du fibrinogène seul, néanmoins l'inhibition suit aussi un modèle polynomiale avec des coefficients proches à ceux observés dans le cas précédent (Figure 20). L'effet est déjà présent à très faible concentration puisque dès 2% de polyNaSS, la diminution de l'adhérence du *S. aureus* est de $17 \pm 2,5\%$. A plus forte concentration l'inhibition semble rester sur un plateau vers 30% inhibition (Figure 20).

Nous avons étudié l'effet de l'ajout de polyNaSS au ciment CERAFIXGENTA® qui présente l'avantage d'être bactéricide par la présence d'antibiotiques dans sa composition. Le polyNaSS a été ajouté au CERAFIXGENTA® selon les mêmes proportions (2, 5 et 10%) que celles utilisées pour le CERAFIX®. L'évaluation de l'adhérence des bactéries a été réalisée selon les mêmes protocoles que précédemment.

Il est à noter que l'effet *in vitro* du CERAFIXGENTA® sur la prolifération de *Staphylococcus aureus* MRSA88244 n'a pas pu être mis en évidence (résultats non présentés dans ce rapport).

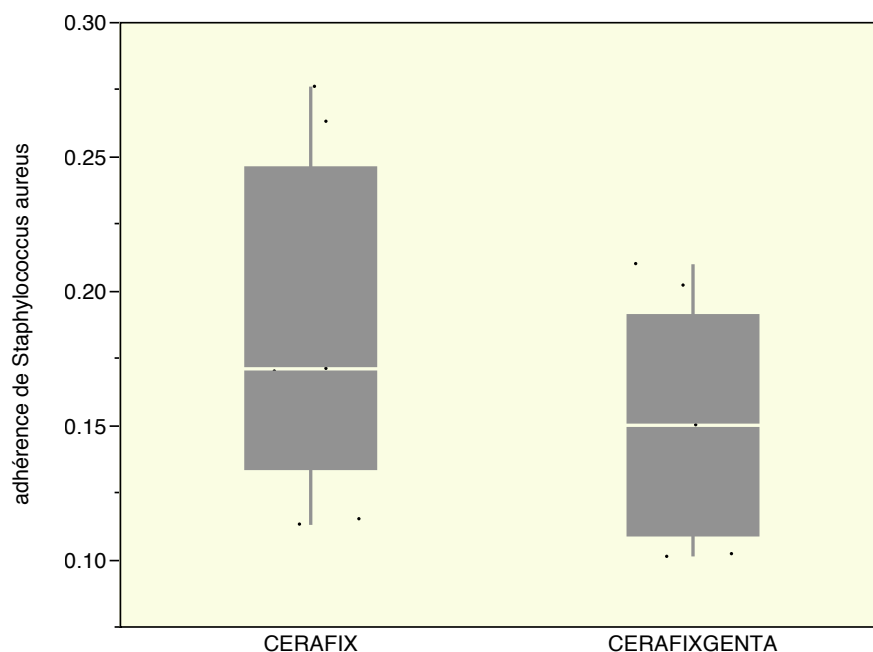


Figure 21 : Comparaison de l'adhérence de *Staphylococcus aureus* sur les contrôles CERAFIX® et CERAFIXGENTA® preadsorbés de protéines plasmatiques.

De plus nous avons mesurée l'adhérence de *Staphylococcus aureus* MRSA88244 et constaté qu'il n'y a pas de diminution de l'adhérence du fait de la présence d'antibiotique dans le ciment (Figure 21). Cette absence d'effet du ciment aux antibiotiques pourrait être dû à la diminution de la sensibilité de la souche testée aux aminosides présents dans le ciment.

% NaSS ajouté au CERAFIXGENTA®	sans pNaSS	avec pNaSS	Diminution adhérence %	Moyenne	SD
2	0.18	0.14	22		
2	0.21	0.16	24		
2	0.17	0.14	18	21	3.20
5	0.10	0.07	31		
5	0.12	0.09	23		
5	0.13	0.10	22	25	5.01
10	0.10	0.07	31		
10	0.20	0.13	36		
10	0.15	0.09	40	36	4.31

Tableau 8: adhérence de *S aureus* sur des échantillons de ciment CERAFIXGENTA® avec du polyNaSS ; les surfaces ont été pré-incubées avec des protéines plasmatiques.

Cependant, l'ajout de polyNaSS conduit à une diminution de l'adhérence de la même manière qu'observé dans le CERAFIX®. Le Tableau 8 présente les données obtenues pour les différentes expériences, les pentes et les diminutions des % d'adhérence sont rapportées pour les mélanges ainsi que pour les contrôles.

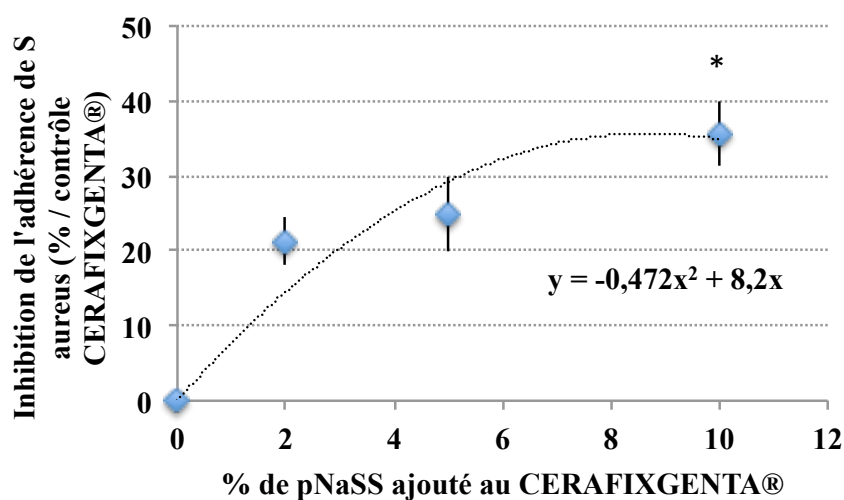


Figure 22: Effet de l'ajout de polyNaSS au CERAFIXGENTA® sur l'adhérence de *S aureus* (pré-incubation avec du plasma) ; *différence significative entre 2 et 10% $p < 0,05$.

Il est à noter une augmentation de l'effet de manière dépendante de la quantité de polyNaSS dans le mélange. L'adhérence de *S aureus* sur le CERAFIXGENTA®/polyNaSS diminue de manière importante par rapport à l'adhérence sur le PMMA présent dans le CERAFIXGENTA® utilisé comme contrôle. Cette inhibition est de 21% dans le mélange CERAFIXGENTA®/polyNaSS à 2% et jusqu'à 37% CERAFIXGENTA®/polyNaSS à 10% (différence significative, $p < 0,05$) (Tableau 8, Figure 22).

3.4. Biocompatibilité *in vitro* des ciments CERAFIX®/polyNaSS

L'évaluation de la biocompatibilité cellulaire *in vitro* est un paramètre important car le ciment choisi doit bloquer l'infection tout en permettant un solide encrage tissulaire. Nous avons choisi d'évaluer la biocompatibilité des mélanges CERAFIX®/polyNaSS vis à vis des d'une lignée d'ostéoblastes, les cellules MC3T3. Deux paramètres cellulaires ont été évalués, la

prolifération cellulaire, par comptage du nombre de cellules adhérentes aux échantillons et la viabilité cellulaire par la méthode du rouge neutre (Figure 23).

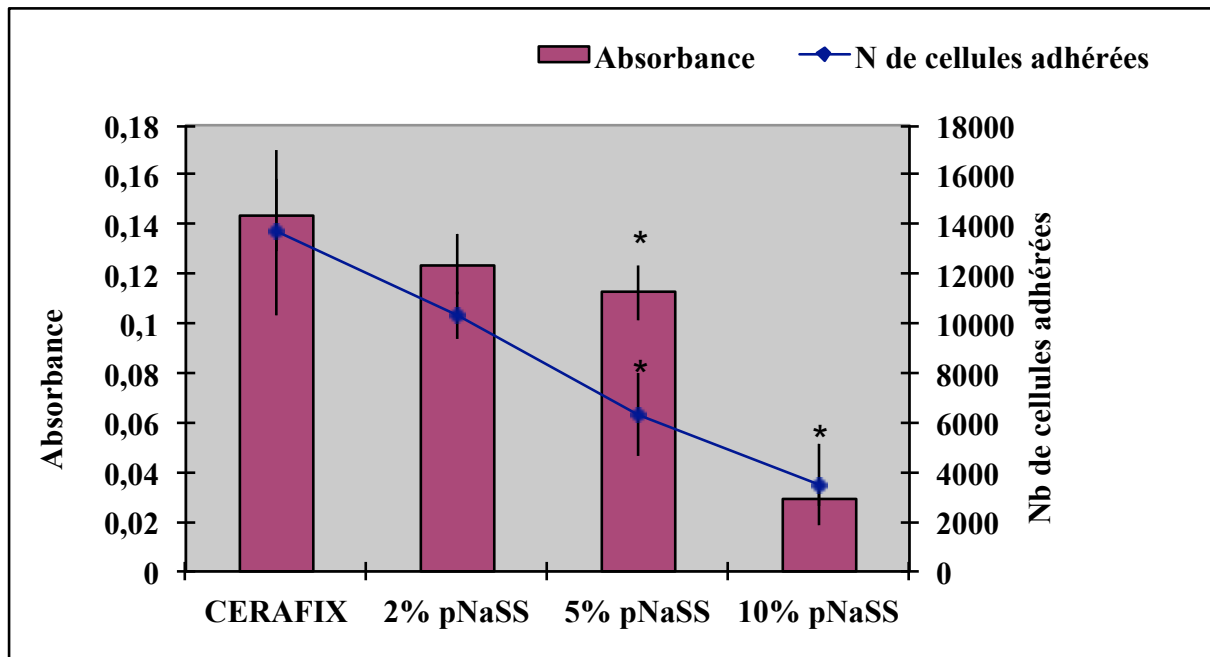


Figure 23: ostéoblastes cultivés sur ciments ; viabilité mise en évidence par le test du rouge neutre (absorbance) ; évaluation de la prolifération sur ciment mélangé avec du NaSS (nombre de cellules après 7 jours de culture) ; * différence significative $p < 0,05$.

Les résultats montrent que après 24h de culture le nombre d'ostéoblastes adhérents est comparable dans le CERAFIX® et dans les mélanges à 2% de CERAFIX®/polyNaSS dans le ciment (pas de différence significative $p < 0,05$). Le mélange à 5% de CERAFIX®/polyNaSS montre une diminution significative dans le nombre de cellules adhérentes et dans la viabilité des cellules ($p < 0,05$). En revanche lorsque le polyNaSS est présente en quantité importante (10%) l'adhérence des cellules ostéoblastiques sur la surface des ciments est fortement inhibée. En ce qui concerne la viabilité des cellules, celle-ci est comparable dans le CERAFIX® et dans les mélanges 2 et 5% alors que la viabilité cellulaire est compromise dans le mélange CERAFIX®/polyNaSS à 10% ($p < 0,05$). Le ciment avec une forte teneur en polyNaSS entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire au contact du ciment et la présence de polyNaSS dans le milieu de culture cellulaire empêche la prolifération cellulaire.

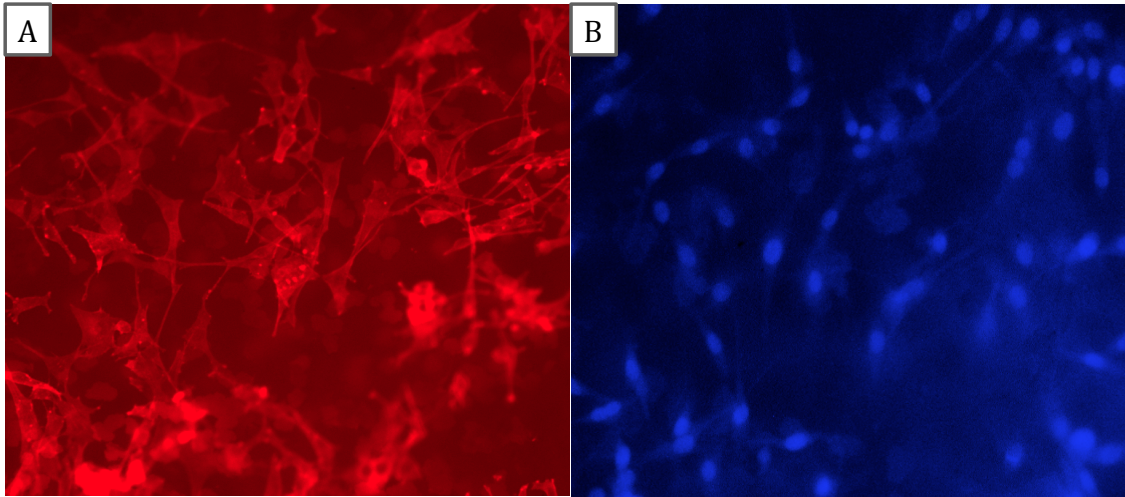


Figure 24: ostéoblastes cultivés sur ciments, marquage des fibres d'actine (A) et des noyaux (B)

La figure 16 montre des images des ostéoblastes cultivés pendant 7 jours sur le mélange CERAFIX®/polyNaSS à 2%. Le marquage de fibres d'actine en rouge (Fig 24-A) ainsi que le marquage des noyaux (Fig 24-B) montrent que les cellules sont étalées et présentent une morphologie normale et attendue pour ce type de cellules. On observe que la surface du ciment a été colonisée et que les cellules forment des prolongations cytoplasmiques et se touchent entre elles montrant le début d'un réseau cellulaire.

Les résultats de cette première partie ont permis de :

-Confirmer qu'il est possible d'obtenir des ciments CERAFIX® /polyNaSS lorsque le pourcentage de polyNaSS est inférieur à 10 %.

-Montrer que la présence de polyNaSS même en faible pourcentage dans le mélange CERAFIX® /polyNaSS présente un important effet inhibiteur de l'adhérence de *Staphylococcus aureus*.

-Montrer l'absence de cytotoxicité des échantillons CERAFIX® /polyNaSS à teneur inférieur de 5% polyNaSS

PARTIE 2 : Mélanges CERAFIX® et CERAFIXGENTA® avec les Copolymères MMA/NaSS

3.5. Production des mélanges CERAFIX®/ copolymères poly(méthyl méthacrylate-co-styrène sulfonate de sodium)

Dans la deuxième partie de cette recherche l'objectif a été d'évaluer l'intérêt des polymères contenant du NaSS dans leurs chaînes polymériques dans la prévention de l'infection. Des mélanges composés des ciments CERAFIX® ou de CERAFIXGENTA® et de copolymères de poly(méthyl méthacrylate-co-styrène sulfonate de sodium) ont été réalisés. Les propriétés de surface et les capacités d'inhibition de l'adhérence des *Staphylococcus aureus* MRSA88244 des mélanges ciments/polymères ont été étudiées en fonction des différentes proportions et compositions de polymères utilisées.

Des copolymère poly(méthyl méthacrylate-co-styrènesulfonate de sodium) de composition molaire en méthacrylate et sulfonate variable ont été synthétisés dans le laboratoire par Mme Ben Aissa I. Après évaluation de leurs propriétés physicochimiques, trois compositions ont été utilisées pour l'étude bactériologique :

-MMA NaSS 95/5 = 95% MMA + 5% NaSS

-MMA NaSS 90/10 = 90% MMA + 10% NaSS

-MMA NaSS 60/40 = 60% MMA + 40% NaSS

Ces copolymères ont été introduits dans les ciments CERAFIX® dans trois proportions : 2, 5 et 10% afin de comparer leurs effets.

3.5.1. MESURE DE L'ANGLE DE CONTACT

La mesure de l'angle de contact réalisée dans les mélanges NaSS/ciments (partie I) avait montré que plus il y avait du NaSS dans le mélange plus l'angle de contact diminuait. En revanche, dans les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS les angles de contact mesurés ne varient quasiment pas. Ni la composition du copolymère (95/5, 90/10, 60/40) ni la proportion de copolymère dans le ciment (2, 5 et 10%) ont conduit à une modification observable de l'angle de contact. Par ailleurs, l'angle de contact diminue en fonction du temps de lavage du mélange CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS.

3.5.2. CINÉTIQUE DE RELARGAGE DES POLYMERES INTRODITS DANS LE CIMENT

Les copolymères MMA/NaSS 95/5 et 90/10 se relarguent à partir du mélange de façon régulière dans le temps, la quantité reste faible à 24h (0% pour les copolymères 90/10 et 1.8% pour les copolymères 95/5). Après 288h de lavage le relargage est toujours faible, on a 4% de copolymère relargué pour les ciments avec 10% de copolymère 90/10 et 3% de copolymère relargué pour les ciments avec 10% de copolymère 95/5. Après 450 heures de lavage, on a 5% de copolymère relargué pour les ciments avec 10% de copolymère 95/5 et 8% de copolymère relargué pour les ciments avec 10% de copolymère 90/10 (Tableau 9).

Temps (h)	95/5 (10% dans le ciment)	90/10(10% dans le ciment)
24	1,8	0
288	3	4
450	5	8

Tableau 9: relargage des copolymères MMA NaSS à partir du ciment

Le relargage du copolymère MMA/NaSS 60/40 se fait de façon très rapide quel que soit le pourcentage de copolymère mélangé dans le ciment. Dans les premières 24h dans l'eau à température ambiante, 37% du copolymère est relargué à partir du mélange à 30% et environ 5% du copolymère à partir des mélanges à 2%, 5% ou 10%.

Dans le cas du mélange à 40%, 55% du copolymère est relargué dans les premières 24h. Ensuite, le relargage reste stable quelles que soient les proportions. Les mêmes résultats ont été observés lorsque les échantillons étaient conditionnés dans du PBS à 37°C (Figure 25).

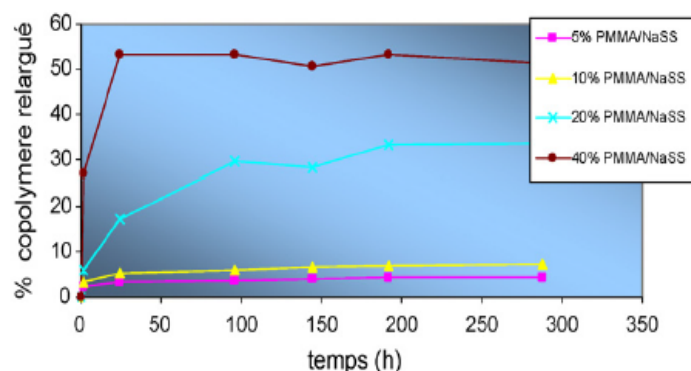


Figure 25 : Pourcentage d'élimination du copolymère PMMA/NaSS (60/40), mélangé au ciment à différentes proportions, en fonction du temps d'immersion dans l'eau.

Résultats publiés dans IRBM, I. Ben Aïssa, T. Bauer et al, 2009.

3.6. Adsorption d'albumine sur les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS

L'adsorption de l'albumine sur les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS a été réalisée pour le copolymère MMA/NaSS 60/40 afin de déterminer la surface réelle accessible aux protéines. Les résultats ont montré une augmentation importante de la surface accessible en fonction de la quantité de NaSS contenu dans le copolymère.

Ainsi, les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS 60/40 à 10 et à 20% respectivement une surface réelle de 407 et 556 fois supérieure à la surface géométrique des échantillons. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus dans le ciment contrôlé CERAFIX® et le ciment avec polyNaSS est présenté dans le Tableau 10.

Ciment	Surface réelle calculée/surface géométrique
CERAFIX®	116
CERAFIX®/polyNaSS 10%	648
CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS 60/40 10%	407
CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS 60/40 20%	556

Tableau 10 : adsorption de l'albumine ; détermination de la surface accessible aux protéines

3.7. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des surfaces CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS

L'observation de l'état des surfaces des mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS a été réalisée par MEB (Figure 26). A faible grossissement (30x et 125 x, Fig 26-A et 26-B respectivement) les images montrent des surface de faible porosité et homogènes. Cependant la présence des zones différentes est observée à fort grossissement (1,5K et 2,5K, Fig 26-C et 26-D respectivement), avec de micro domaines dans lesquels des zones poreuses peuvent être observées (Fig 26-D zoom).

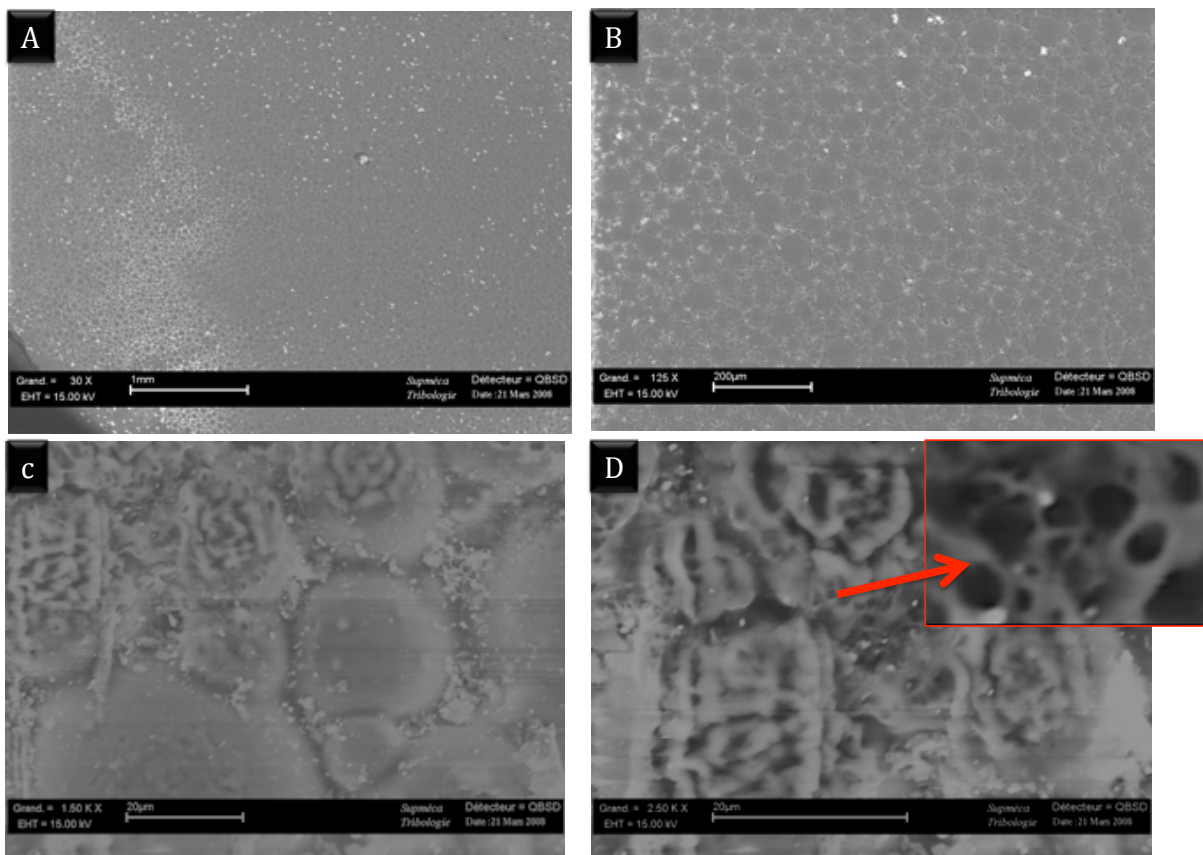


Figure 26 : image MEB, observation de la surface du CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS 95/5

3.8. Adhérence de *Staphylococcus aureus* sur les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS

Les mesures d'adhérence bactérienne ont été réalisées avec la souche clinique de *Staphylococcus aureus* MRSA88224 dans toutes les expériences. L'adhérence de *S. aureus* a été étudiée sur des ciments CERAFIX® mélangés aux copolymères MMA/NaSS de composition différente : MMA NaSS 95/5 ; MMA NaSS 90/10 MMA NaSS 60/40. Afin de calculer l'inhibition de l'adhérence, et d'assurer les conditions de parfaite neutralité dans l'évaluation, la réalisation d'une courbe contrôle a été nécessaire à chaque expérience.

De la même manière que dans la partie précédente, le nombre de bactéries adhérees est porté en fonction du nombre de bactéries adhérees après incubation sur le ciment préadsorbé de protéines plasmatiques. Une régression linéaire est réalisée et la pente de la droite (exprimée en pourcentage) représente l'adhérence des bactéries sur les surfaces étudiées⁶³.

3.8.1. ADHERENCE DE *S. AUREUS* SUR LES CIMENTS CERAFIX®/ MMA/NaSS 95/5

L'adhérence de *S. aureus* a été étudiée sur des ciments CERAFIX® mélangés aux copolymères MMA/NaSS 95/5 dans trois proportions : 2, 5 et 10%. Les expériences ont été réalisées trois fois pour chacune des proportions.

Le Tableau 11 présente les résultats obtenus dans une des trois expériences du mélange CERAFIX®/MMANass 95/5 à 10%. Plusieurs dilutions de la suspension mère des bactéries sont incubées en triplicata. Le nombre de bactéries adhérees sur le CERAFIX®/MMANass 95/5 à 10% est systématiquement inférieur à celui du CERAFIX® seul (Tableau 11). A partir des trois droites de régression linéaire, trois pentes ont été obtenues pour chaque condition, 2, 5 et 10% de copolymère dans le mélange. Les pentes correspondant aux mélanges CERAFIX®/MMANass 95/5 sont plus faibles que celles des contrôles, mais l'effet est plus clairement observé lorsque la quantité de copolymère dans le mélange est plus importante. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Suspension mère CFU/mL	Dilutions de la SM	CFU incubées	CFU adhérees CERAFIX®	CFU adhérees CERAFIX®/ MMANass 95/5 à 10%
13720000	3/4 1	4512000	872100	836100
	3/4 2	4512000	741300	676300
	3/4 3	4512000	792100	754200
	1/2 1	3729000	592300	565100
	1/2 2	3729000	692800	614300
	1/2 3	3729000	567900	524200
	1/4 1	2843000	512000	461900
	1/4 2	2843000	483100	453100
	1/4 3	2843000	409600	362800
	1/8 1	1846000	342400	276300
	1/8 2	1846000	426400	301900
	1/8 3	1846000	387200	210200

Tableau 11 : Adhérence plasma CERAFIX®/MMANass 95/5 ajouté à 10% expérience N°3

% MMANass 95/5 ajouté au CERAFIX®	avec MMANaSS 95/5	Inhibition adhérence %	Moyenne	SD
2	0.220	0.214	3	
2	0.195	0.196	-1	
2	0.123	0.117	5	2.71
5	0.170	0.164	4	
5	0.250	0.240	4	
5	0.110	0.108	2	3 1.15
10	0.251	0.240	4	
10	0.222	0.210	5	
10	0.174	0.158	9	6 2.54

Tableau 12: inhibition de l'adhérence de *S. aureus* par l'ajout du copolymère MMA NaSS 95/5 au ciment CERAFIX®

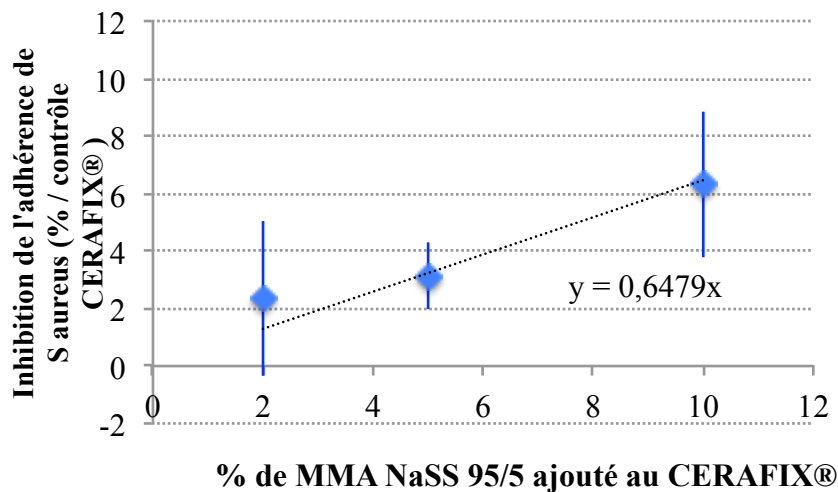


Figure 27: inhibition de l'adhérence de *S. aureus* par l'ajout du copolymère MMA NaSS 95/5 au ciment CERAFIX®

L'inhibition de l'adhérence de *S. aureus* augmente avec la quantité de copolymère MMA NaSS 95/5 ajouté au CERAFIX® (Figure 27). A la différence des ciments contenant du polyNaSS, l'inhibition obtenue par l'ajout de copolymères suit un modèle linéaire. Bien que les déviations standard restent importantes, une tendance de proportionnalité peut être mise en évidence entre l'inhibition et la présence de copolymère dans le mélange. Nous avons pu observer un maximum de 6% d'inhibition lorsque le copolymère MMA NaSS 95/5 est présent à 10% dans le CERAFIX®.

3.8.2. ADHERENCE DE S AUREUS SUR LES CIMENTS CERAFIX®/ MMA/NaSS 90/10

L'adhérence de *S. aureus* a été étudiée sur des ciments CERAFIX® mélangés aux copolymères MMA/NaSS 90/0 dans trois proportions : 2, 5 et 10%. Les expériences ont été réalisées trois fois pour chacune des proportions. Le Tableau 13 présente les pentes des droites obtenues pour chacune des expériences ainsi que l'inhibition de l'adhérence calculée en %/ CERAFIX®. Le nombre de bactéries adhérentes sur le CERAFIX®/MMANass 90/10 est systématiquement inférieur à celui du CERAFIX® seul (Tableau 13).

% MMA NaSS 90/10 ajouté au CERAFIX®	avec MMA/NaSS 90/10	Inhibition adhérence %	Moyenne	SD
2	0.121	0.114	6	
2	0.275	0.264	4	
2	0.174	0.170	2	4.0
5	0.191	0.188	2	
5	0.245	0.243	1	
5	0.167	0.158	5	2.6
10	0.137	0.124	9	
10	0.235	0.228	3	
10	0.170	0.158	7	6.5

Tableau 13 : inhibition de l'adhérence de *S. aureus* par l'ajout du copolymère MMA NaSS 90/10 au ciment CERAFIX®

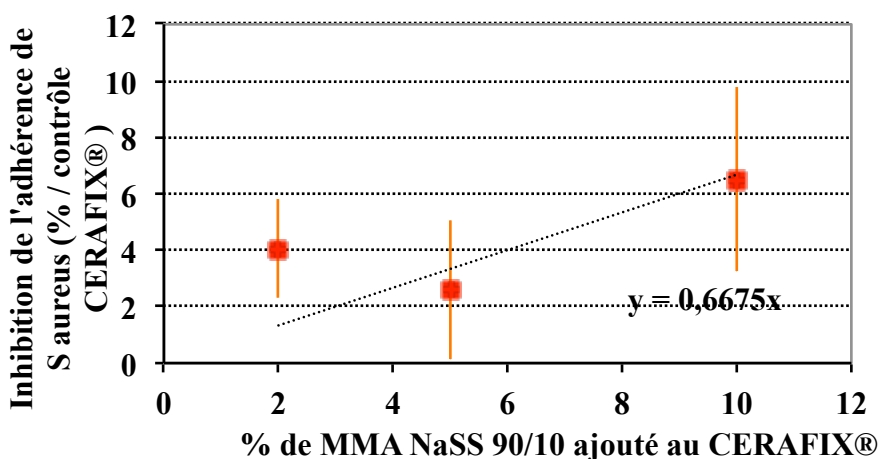


Figure 28: inhibition de l'adhérence de *S. aureus* par l'ajout du copolymère MMA NaSS 90/10 au ciment CERAFIX®

La mesure de l'adhérence bactérienne pour les mélanges CERAFIX®/MMANass 90/10 est présentée dans la Figure 28. Comme dans le cas précédent, les résultats montrent l'inhibition de l'adhérence du *S. aureus* par la présence de NaSS. Les proportions de 2 et 5% de MMANass 90/10 dans le mélange conduisent à une inhibition faible et aucune corrélation entre la quantité de NaSS dans le mélange et l'inhibition de l'adhérence ne peut être mise en évidence. L'inhibition la plus importante est constatée à hauteur de 6% pour la proportion la

plus forte de copolymère dans le mélange. La dispersion des résultats ne permet pas de mettre en évidence des différences significatives par les tests statistiques. Ces résultats sont comparables à ceux présentés pour le copolymère MMA NaSS 95/5.

3.8.3. ADHERENCE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUR LES CIMENTS CERAFIX®/ MMA/NaSS 60/40

L'adhérence de *S. aureus* a été étudiée sur des ciments CERAFIX® mélangés aux copolymères MMA/NaSS 60/40 dans trois proportions : 2, 5 et 10%. Les expériences ont été réalisées trois fois pour chacune des proportions. Le Tableau 14 présente les pentes des droites obtenues pour chacune des expériences ainsi que l'inhibition de l'adhérence calculée en %/ CERAFIX®.

% MMA NaSS 60/40 ajouté au CERAFIX®	CERAFIX®	Avec MMA NaSS 60/40	Diminution adhérence %	Moyenne	SD
2	0.110	0.106	3.64		
2	0.147	0.139	5.44		
2	0.225	0.218	3.11	4.1	1.22
5	0.128	0.118	7.81		
5	0.179	0.175	2.23		
5	0.23	0.215	6.52	5.5	2.92
10	0.145	0.127	12.41		
10	0.254	0.218	14.17		
10	0.165	0.149	9.70	12.1	2.26

Tableau 14 : inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymere MMA NaSS 60/40 au ciment CERAFIX®

Le nombre de bactéries adhérees sur le CERAFIX®/MMANass 60/40 est inférieur à celui du CERAFIX® seul (Tableau 14). La différence de pentes calculées montre une inhibition de adhérence allant de 4 à 12%.

La Figure 29 présente l'inhibition de l'adhérence en fonction du % de copolymère MMA NaSS 60/40 ajouté au CERAFIX®. On observe une inhibition supérieure à celle observée dans le cas de copolymères précédents car pour le mélange à 10% l'inhibition est de $12 \pm 2,26\%$. La corrélation linéaire répond à un coefficient de 1,21, deux fois plus important que ceux observés pour les copolymères 90/10 (0,67) et 95/5 (0,65).

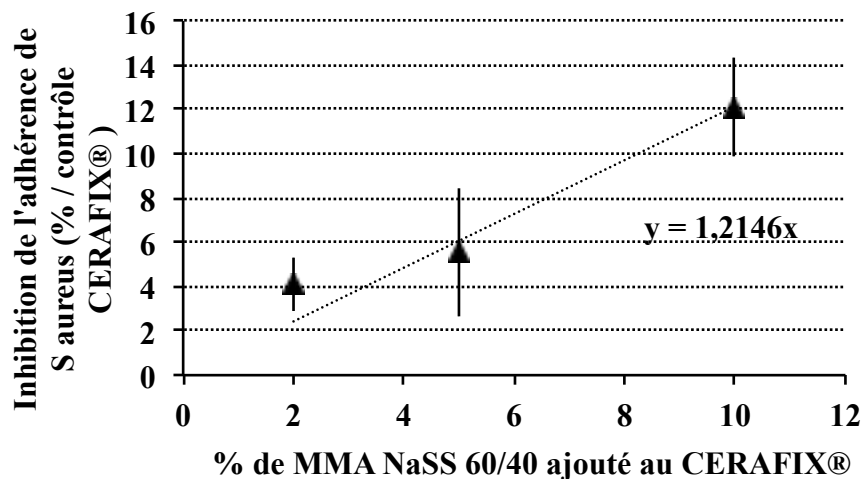


Figure 29: inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymère MMA NaSS 60/40 au ciment CERAFIX®

L'adhérence de *S. aureus* a aussi été étudiée sur des ciments mélangés aux copolymères MMA/NaSS 60/40 à 20% (résultats non présentés). Cette expérience a montré une inhibition de l'adhérence de *S. aureus* de 21% sur le CERAFIX®/MMA/NaSS 60/40 à 20% par rapport au CERAFIX® contrôle. Il semble qu'une proportion plus importante de copolymères dans le mélange pourrait permettre une inhibition plus forte de l'adhérence.

Cependant une augmentation trop importante de la proportion de copolymère dans le CERAFIX® conduit au changement d'autres paramètres comme les propriétés de surface, la biocompatibilité et les propriétés mécaniques du ciment. Pour ces raisons la composition du ciment doit permettre un compromis équilibré entre les différentes propriétés requises.

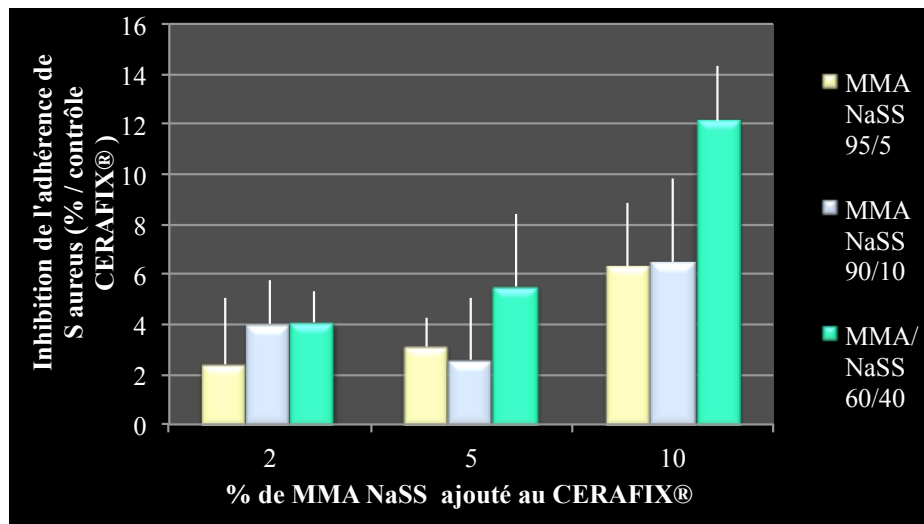


Figure 30 : Comparaison de l'activité antibactérienne des trois polymères mélangés au CERAFIX®

Les résultats obtenus dans les trois mélanges de CERAFIX®/MMA NaSS sont présentés dans la Figure 30. Il est à noter que les trois compositions des polymères présentes à 2% dans le CERAFIX® conduisent à une inhibition de l'adhérence de *S aureus* faible comprise entre 2 et 4%. Un effet comparable est observé à 5% de CERAFIX®/MMA NaSS. Lorsque la quantité de copolymère est plus importante on commence à observer un effet plus important (entre 6 et 12% d'inhibition).

3.9. Observation des bactéries adhérentes sur les surfaces CERAFIX®/MMA NaSS par MEB

Après avoir réalisé une expérience d'adhérence sur des ciments préadsorbés avec du plasma et selon le même protocole utilisé précédemment, les bactéries ont été fixées sur les surfaces de ciments et observées en MEB. Nous avons déjà mis en évidence la présence de zones hétérogènes dans la surface des mélanges par MEB. La Figure 31 présente l'adhérence sur CERAFIX®/MMA NaSS à 5% avec un grossissement de 1500x (Fig 31-A) et avec un grossissement de 5000x (Fig 31-B). Il est intéressant d'observer que les bactéries adhèrent plutôt dans les zones d'interstice ou de liaison entre les microdomaines de la surface (flèches rouges). L'observation à très fort grossissement (5000x Fig 31-B) permet de mettre en

évidence que les bactéries ne se placent pas dans les pores, mais elles se disposent en groupes dans les zones voisines aux pores (flèches rouges).

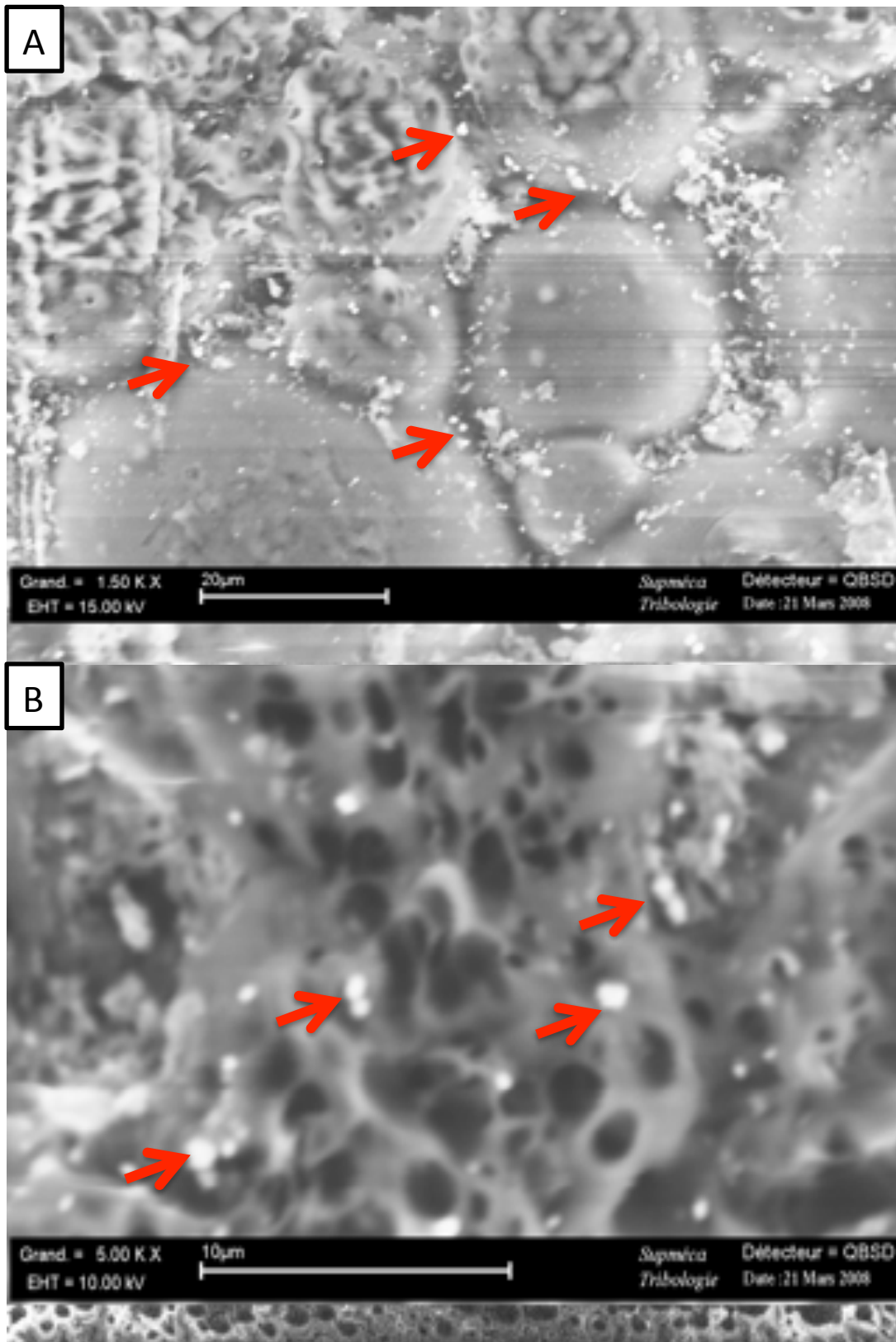


Figure 31 : adhérence de staphylococcus sur les surfaces des mélanges 95/5 à 5%

3.10. Biocompatibilité *in vitro* des ciments CERAFIX®/MMA NaSS

Cette partie de l'étude a été réalisée en collaboration avec Mme Ines Ben Aisa. L'étude a porté sur la viabilité, la morphologie et la prolifération de cellules au contact du CERAFIX®/MMA NaSS 95/5.

Les résultats montrent qu'en présence du mélange ciment/copolymère, la viabilité cellulaire est de 60% en moyenne. Seuls les ciments sans polymères non lavés et les mélanges ciment/copolymère PMMA/NaSS 95/5 non lavés n'entraînent pas d'effet sur la viabilité cellulaire à 24h. Cependant, des ostéoblastes viables et proliférant après 7 jours de culture sur les surfaces des mélanges ont été mis en évidence, comme le montrent les images MEB sur la Figure 32.

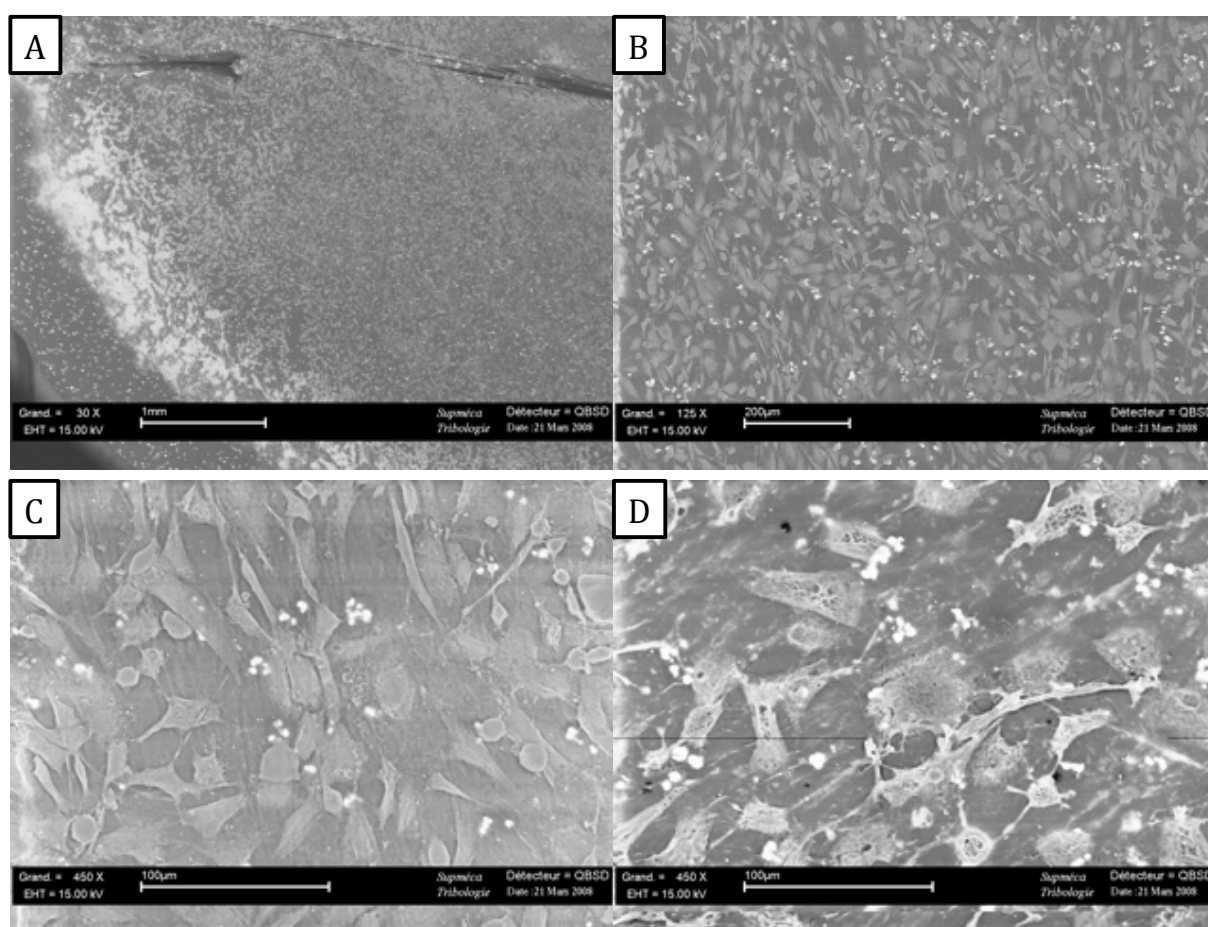


Figure 32 : ostéoblastes MC3T3 après 7 jours de culture sur des ciments mélangés à 5% de copolymère.

L'observation à faible grossissement montre une prolifération cellulaire homogène (Fig 32-A et 32-B). A plus fort grossissement (450x) les cellules montrent un étalement normal, avec des prolongations et liaisons intercellulaires leur permettant la colonisation de la surface et un encrage efficace (Fig 32 -C et 32-D).

L'effet des mélanges CERAFIX®/MMA NaSS 95/5 à 20% sur l'activité enzymatique cellulaire a été évalué par dosage de phosphatases alcalines après trois semaines de culture. Une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline est observée lors que les cellules sont cultivées sur les mélanges MMA NaSS 95/5. Cependant après lavage des échantillons, l'activité phosphatase alcaline est moins diminuée. Une absence de minéralisation au contact des ciments mélangés aux polymères a été observée.

3.11. Adhérence de *Staphylococcus aureus* sur les mélanges CERAFIXGENTA® /copolymère MMA/NaSS

La gentamicine est présente dans la formulation du CERAFIXGENTA® sous forme de sulfate de gentamicine. La prolifération des bactéries au contact du ciment CERAFIXGENTA® est ainsi bloquée par l'antibiotique présent à hauteur de 800 mg de dans la composition du ciment. Le ciment assure une bactéricidie au niveau osseux au-dessus de la concentration minimale inhibitrice de 4 mg / L avec un taux sanguin au-dessous du seuil de toxicité⁴⁶⁻⁴⁸.

Nous avons ensuite étudié l'adhérence des bactéries *Staphylococcus aureus* MRSA88244 sur le CERAFIXGENTA® selon les protocoles décrits précédemment. L'introduction des copolymères MMA NaSS dans la composition du CERAFIXGENTA® a été réalisé selon les mêmes proportions (2, 5 et 10%) que celles utilisées pour le CERAFIX®.

3.12. Adhérence de *S aureus* sur les ciments CERAFIXGENTA®/ MMA/NaSS 95/5

Les expériences ont été réalisées trois fois pour chacune des proportions. Le Tableau 15 présente les pentes des droites obtenues pour chacune des expériences ainsi que l'inhibition de l'adhérence calculée en %/ CERAFIXGENTA®. Le nombre de bactéries adhérentes (représenté par les pentes des droites) sur le CERAFIXGENTA®/MMANass 95/5 est inférieur à celui du CERAFIX® seul (Tableau 15).

L'adhérence de *S. aureus* diminue faiblement avec 2 et 5% de copolymère MMA NaSS 95/5 ajouté au CERAFIXGENTA® (Figure 33). L'inhibition est de 7,4% avec une quantité de 10% de copolymère dans le mélange. Les déviations standard restent importantes et ne permettent pas de mettre en évidence des différences significatives par les tests statistiques. Il est à noter que l'inhibition suit un modèle linéaire, avec un coefficient légèrement plus important que dans le mélange sans antibiotique.

% MMANaSS 95/5 ajouté au CERAFIX GENTA®	CERAFIX GENTA®	avec MMANaSS 95/5	Inhibition adhérence %	Moyenne	SD
2	0.142	0.140	1.41		
2	0.158	0.152	3.80		
2	0.215	0.207	3.72	3.0	1.36
5	0.155	0.150	3.23		
5	0.112	0.107	4.46		
5	0.186	0.183	1.61	3.1	1.43
10	0.159	0.147	7.55		
10	0.236	0.223	5.51		
10	0.120	0.109	9.17	7.4	1.83

Tableau 15 : inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymère MMA NaSS 95/5 au ciment CERAFIXGENTA®

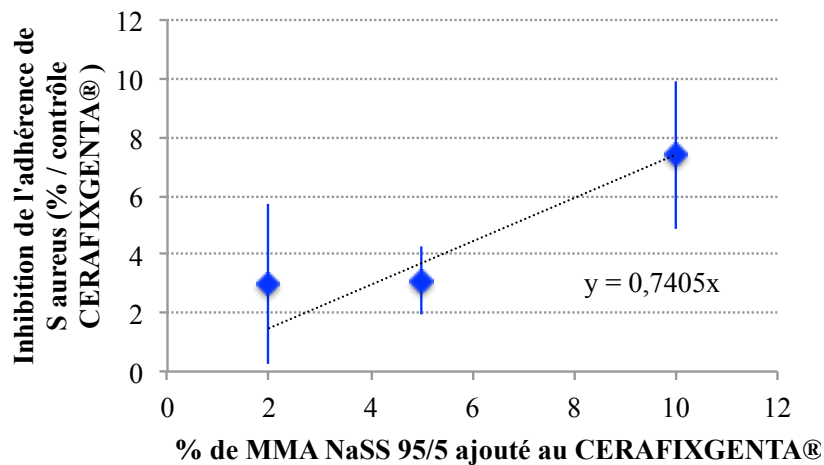


Figure 33: inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymère MMA NaSS 95/5 au ciment CERAFIXGENTA®

3.13. Adhérence de *Staphylococcus aureus* sur les ciments CERAFIXGENTA®/ MMA/NaSS 90/10

L'inhibition de l'adhérence bactérienne pour les mélanges CERAFIXGENTA®/MMANaSS 90/10 est présentée dans le Tableau 16 et la Figure 34.

% MMA NaSS 90/10 ajouté au CERAFIX GENTA®	CERAFIX GENTA®	avec MMA/ NaSS 90/10	Diminution adhérence %	Moyenne	SD
2	0.142	0.14	1.41		
2	0.184	0.176	4.35		
2	0.226	0.217	3.98	3.2	1.60
5	0.121	0.117	3.31		
5	0.245	0.239	2.45		
5	0.175	0.162	7.43	4.4	2.66
10	0.235	0.227	3.40		
10	0.127	0.115	9.45		
10	0.145	0.137	5.52	6.1	3.07

Tableau 16 : inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymère MMA NaSS 90/10 au ciment CERAFIXGENTA®

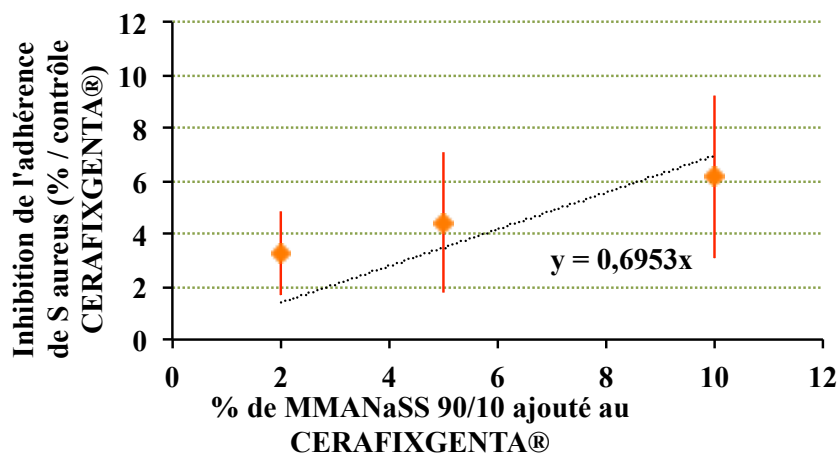


Figure 34 : inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymère MMA NaSS 90/10 au ciment CERAFIXGENTA®

Les résultats montrent une inhibition de l'adhérence du *S. aureus* par la présence de NaSS dans le copolymère, malgré une dispersion importante des données. Les proportions de 2 et 5% de MMA/NaSS 90/10 dans le mélange conduisent à une inhibition faible ($3,2 \pm 1,6$ et $4,4 \pm 2,66\%$ d'inhibition respectivement). A 10% de copolymère dans le CERAFIXGENTA® l'inhibition est plus importante (environ $6,1 \pm 3,07\%$). L'inhibition suit un modèle linéaire.

Une corrélation entre la quantité de copolymère dans le mélange et le % d'inhibition se dégage de la Figure 34. La dispersion des résultats ne permet pas de mettre en évidence des différences significatives par les tests statistiques. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour le copolymère MMA NaSS 95/5.

3.14. Adhérence de *S aureus* sur les ciments CERAFIXGENTA®/ MMA/NaSS 60/40

L'adhérence de *S. aureus* a été étudiée sur des ciments CERAFIXGENTA® mélangés aux copolymères MMA/NaSS 60/40 dans trois proportions : 2, 5 et 10%. Les expériences ont été réalisées trois fois pour chacune des proportions. Le Tableau 17 présente les pentes des droites obtenues pour chacune des expériences ainsi que l'inhibition de l'adhérence calculée en %/ CERAFIXGENTA®.

% MMA NaSS 60/40 ajouté au CERAFIX GENTA®	CERAFIX GENTA®	avec MMA/ NaSS 60/40	Diminution adhérence %	Moyenne	SD
2	0.12	0.117	2.50		
2	0.186	0.178	4.30		
2	0.115	0.113	1.74	2.8	1.32
5	0.23	0.227	1.30		
5	0.135	0.127	5.93		
5	0.176	0.172	2.27	3.2	2.44
10	0.102	0.092	9.80		
10	0.276	0.253	8.33		
10	0.16	0.136	15.00	11.0	3.50

Tableau 17 : inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymère MMA NaSS 60/40 au ciment CERAFIXGENTA®

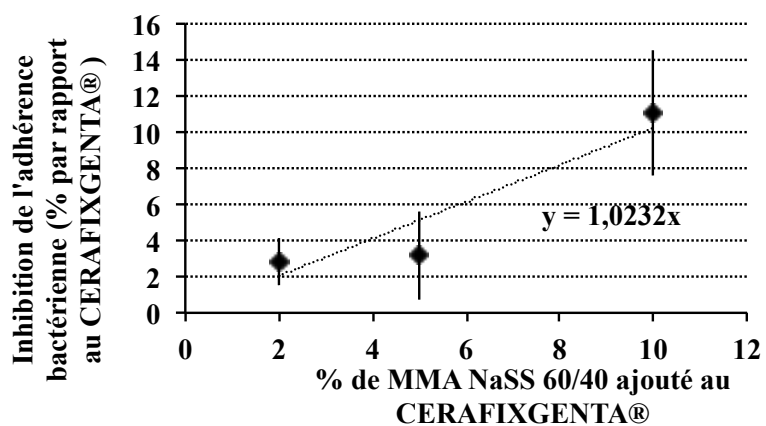


Figure 35: inhibition de l'adhérence de *S aureus* par l'ajout de copolymère MMA NaSS 60/40 au ciment CERAFIXGENTA®

Le nombre de bactéries adhérentes sur le CERAFIXGENTA®/MMANaSS 60/40 est inférieur à celui du CERAFIXGENTA® seul (Tableau 17). La différence de pentes calculées montre une inhibition de adhérence allant de 2,8 à 11%. La Figure 35 présente l'inhibition de l'adhérence en fonction du % de copolymère 60/40 ajouté au CERAFIXGENTA®. On observe une inhibition de $11 \pm 3,5\%$ dans le cas des mélanges à 10%.

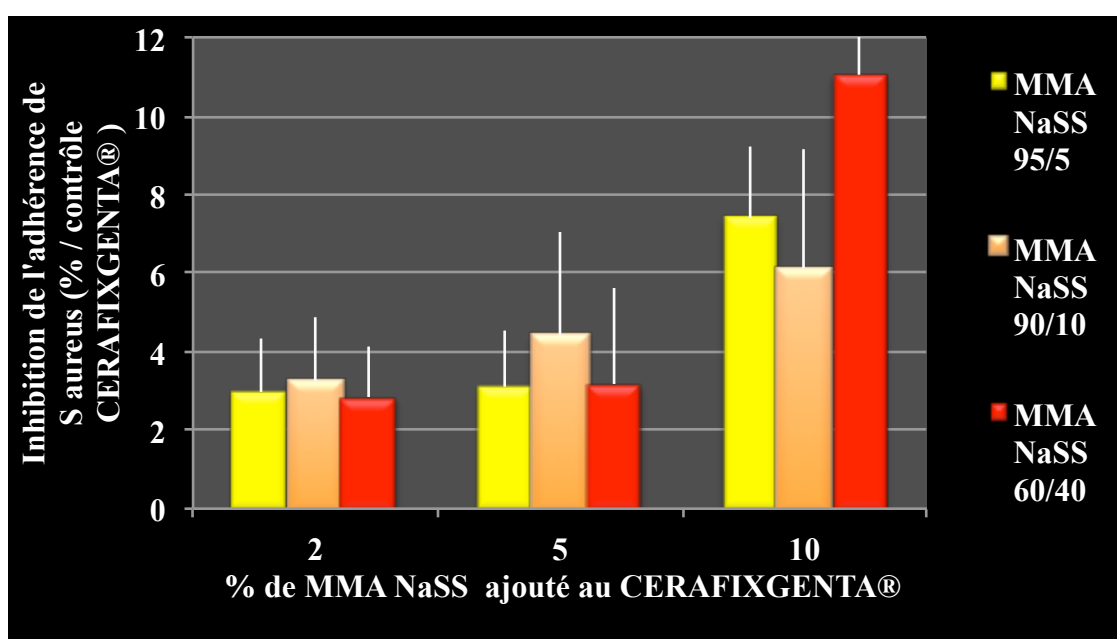


Figure 36 : Comparaison de l'activité antibactérienne des trois polymères mélangés au CERAFIX®

La comparaison des résultats obtenus avec les trois mélanges CERAFIXGENTA®/MMANaSS est présentée dans la Figure 36. Il est à noter que l'inhibition la plus forte est obtenue pour les mélanges à 10% et en particulier, le copolymère MMA NaSS 60/40 présente l'activité la plus importante. L'inhibition de l'adhérence de *S. aureus* au contact de ciments CERAFIXGENTA® n'est pas plus importante que celle observée sur des ciments CERAFIX®. Par ailleurs nous avons aussi évalué la prolifération de la souche *Staphylococcus aureus* MRSA88244 en présence de CERAFIXGENTA® (Figure 21) mais

aucun effet *in vitro* n'a pu être observé. Cette absence d'effet aussi bien dans l'adhérence que dans la prolifération des bactéries pourrait être due à la diminution de la sensibilité de cette souche testée aux aminosides. Néanmoins une faible concentration locale d'antibiotique à la surface du ciment à des temps très courts après le contact avec les milieux physiologiques pourrait aussi être à l'origine de l'absence d'effet antibactérien. Nous avons évalué l'activité après 1h de contact, il est possible que la diffusion de la gentamicine ne soit pas suffisante. D'après Bunetel *et al* 1994⁴⁹ un pic de concentration sanguine de gentamicine à partir du CERAFIXGENTA® est observé après 3h d'implantation dans un modèle de mouton. En ce qui concerne la concentration osseuse d'antibiotique, des expériences ont été menées après 24h de contact.

Les résultats de la deuxième partie de l'étude ont permis de :

-Souligner un comportement proche entre le CERAFIX® et le CERAFIXGENTA® après 1h de contact avec les milieux physiologiques

-Optimiser la production des mélanges CERAFIXGENTA®/MMANass à différents pourcentages et compositions

-Mettre en évidence l'activité inhibitrice des mélanges

-Montrer que le copolymère MMA NaSS 60/40 présente l'activité inhibitrice de l'adhérence bactérienne la plus importante

-Mettre en évidence la biocompatibilité in vitro des mélanges

Chapitre 4

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les infections bactériennes sur implants prothétiques représentent un des problèmes majeurs de santé publique et une des premières causes de bactériémies nosocomiales. Ces infections ne répondent pas toujours à l'antibiothérapie conduisant au retrait de la prothèse pour éradiquer l'infection. Plusieurs stratégies sont proposées et sont encore à l'étude; parmi elles l'inclusion de molécules bactéricides inhibitrices de l'adhérence bactérienne représente une des solutions réellement prometteuses.

Cette étude a été dédiée à la mise au point de nouveaux ciments acryliques modifiés par des polymères inhibiteurs de l'adhérence bactérienne. Dans la première partie, l'étude réalisée sur des mélanges du CERAFIX® et du CERAFIXGENTA® avec le polyNaSS a permis d'optimiser les conditions et montrer la faisabilité des préparations sans modifier les propriétés et le temps de polymérisation du ciment. L'évaluation chimique a permis de préciser l'importance du relargage des polymères surtout dans les 24 premières heures pour les mélanges contenant de fortes proportions de polyNaSS. Ce relargage semble entraîner des modifications architecturales du ciment avec augmentation de la porosité. L'étude a mis en évidence que la présence de polyNaSS même en faible pourcentage apporte au ciment un effet inhibiteur de l'adhérence bactérienne de *S. aureus* en système purifié –fibrinogène seul- et en mélange plasmatique. L'effet inhibiteur est très important : entre 20 et 40% d'inhibition selon les mélanges. De plus, ces ciments modifiés ont montré une biocompatibilité cellulaire au contact des ostéoblastes lorsque le pourcentage ne dépasse pas le 5%.

Les mélanges des ciments CERAFIX® et CERAFIXGENTA® avec des copolymères MMA/NaSS ont des propriétés d'inhibition de l'adhérence bactérienne plus faibles que celles obtenues avec le polyNaSS. L'effet inhibiteur suit un modèle linéaire d'inhibition et leurs activités sont dépendantes de la quantité de copolymère dans le mélange. Les mélanges CERAFIX®/copolymère MMA/NaSS 60/40 montrent la capacité d'inhibition de l'adhérence la plus importante, environ 11%. Ces mélanges sont biocompatibles et ne conduisent pas à des modifications de la morphologie des ostéoblastes.

Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus permettent de montrer que le ciment CERAFIXGENTA® n'a pas un effet bactéricide immédiat et ne conduit pas à une inhibition de l'adhérence de bactéries sur les ciments. L'objectif de l'ajout de ces mélanges est d'avoir un rôle dans la prophylaxie des infections sur prothèse articulaires. L'effet de ces copolymères est envisagé lors de la pose de l'implant et donc leur effet doit être maximal immédiatement et de durée limitée.

Néanmoins nous avons pu constater que les copolymères mélangés avec du ciment chirurgical CERAFIX® et CERAFIXGENTA® diminuent l'adhérence bactérienne mais pourraient modifier de manière significative la surface du ciment. Les observations en microscopie électronique des mélanges montrent des hétérogénéités de surfaces avec la présence des zones de porosité augmentée dues à la présence de copolymères. Ces observations semblent indiquer que bien que cette stratégie de prévention de l'infection des arthroplasties semble être très attrayante et fiable, les modifications mécaniques sur les surfaces d'implants pourraient conduire à l'échec précoce avec descellement. L'étude biomécanique sur les différents mélanges de ciment et de polymères est nécessaire afin de préciser l'influence de la présence aussi bien du polyNaSS que des copolymères MMA/NaSS sur les qualités mécaniques du ciment. Ces études permettront aussi de trouver le dosage optimal à obtenir pour maintenir les caractéristiques mécaniques du ciment tout en conservant les propriétés antiadhésives.

5. REFERENCES

1. Lewis G. Properties of antibiotic-loaded acrylic bone cements for use in cemented arthroplasties: A state-of-the-art review. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2009;89:558-574
2. Parker MJ, Gurusamy KS, Azegami S. Arthroplasties (with and without bone cement) for proximal femoral fractures in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2010:CD001706
3. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of the antibiotic-loaded bone cements. *Acta Orthop Scand* 2001;72
4. Urquhart DM, Hanna FS, Brennan SL, Wluka AE, Leder K, Cameron PA, Graves SE, Cicuttini FM. Incidence and risk factors for deep surgical site infection after primary total hip arthroplasty: A systematic review. *The Journal of arthroplasty*. 2010;25:1216-1222 e1211-1213
5. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *The New England journal of medicine*. 2004;351:1645-1654
6. Gristina AG. Biofilms and chronic bacterial infections. *Clinical Microbiology Newsletter*. 1994;16:171-176
7. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: A haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection*. 2001;49:87-93
8. Belmatoug N, Fantin B. Contribution of animal models of infection for the evaluation of the activity of antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1997;9:73-82
9. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*. 2006;27:2331-2339
10. Byren I, Bejon P, Atkins BL, Angus B, Masters S, McLardy-Smith P, Gundle R, Berendt A. One hundred and twelve infected arthroplasties treated with 'dair' (debridement, antibiotics and implant retention): Antibiotic duration and outcome. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63:1264-1271

11. Moran E, Masters S, Berendt AR, McLardy-Smith P, Byren I, Atkins BL. Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: The microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention. *The Journal of infection*. 2007;55:1-7
12. Peel TN, Dowsey MM, Daffy JR, Stanley PA, Choong PF, Buising KL. Risk factors for prosthetic hip and knee infections according to arthroplasty site. *J Hosp Infect* 2011;79:129-133
13. Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD, Montanaro L. Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;830:29-46
14. Francois P, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP. Host-bacteria interactions in foreign body infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996;17:514-520
15. Francois P, Vaudaux P, Lew PD. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann Vasc Surg*. 1998;12:34-40
16. Bisognano C, Vaudaux P, Rohner P, Lew DP, Hooper DC. Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant staphylococcus aureus by subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1428-1437.
17. Darouiche RO, Landon GC, Patti JM, Nguyen LL, Fernau RC, McDevitt D, Greene C, Foster T, Klima M. Role of staphylococcus aureus surface adhesins in orthopaedic device infections: Are results model-dependent? *J Med Microbiol*. 1997;46:75-79.
18. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 2012;33:5967-5982
19. Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clinical orthopaedics and related research*. 2005:7-11
20. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *The International journal of artificial organs*. 2005;28:1062-1068
21. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, Kathju S, Stoodley P. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future microbiology*. 2014;9:987-1007
22. Lange J, Troelsen A, Thomsen RW, Søballe K. Chronic infections in hip arthroplasties: Comparing risk of reinfection following one-stage and two-stage

- revision: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Epidemiology*. 2012;4:57-73
23. Huang CT, Yu FP, McFeters GA, Stewart PS. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and environmental microbiology*. 1995;61:2252-2256
 24. Hoiby N. Recent advances in the treatment of pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis. *BMC medicine*. 2011;9:32
 25. Cerca N, Martins S, Sillankorva S, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on staphylococcus epidermidis and staphylococcus haemolyticus biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71:8677-8682
 26. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through staphylococcus aureus biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2467-2473
 27. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*. 2011;3:55-65
 28. Song Z, Borgwardt L, Hoiby N, Wu H, Sorensen TS, Borgwardt A. Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: The possible role of bacterial biofilms. *Orthopedic reviews*. 2013;5:65-71
 29. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:322-332
 30. Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials*. 2005;26:6423-6429
 31. Alkhraisat MH, Rueda C, Marino FT, Torres J, Jerez LB, Gbureck U, Cabarcos EL. The effect of hyaluronic acid on brushite cement cohesion. *Acta Biomater*. 2009;5:3150-3156
 32. Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler J-M. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomaterialia*. 2014;10:1035-1049
 33. Fontanille M, Timar M. Ciment pour fixation de prothèses d'os. 1990
 34. Charnley J. Surgery of the hip-joint: Present and future developments. *British medical journal*. 1960;1:821-826

35. Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cements: Mechanical and physical properties. *The Orthopedic clinics of North America*. 2005;36:29-39, v-vi
36. Passuti N, Gouin F. Antibiotic-loaded bone cement in orthopedic surgery. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2003;70:169-174
37. Lacroix D, Murphy LA, Prendergast PJ. Three-dimensional finite element analysis of glenoid replacement prostheses: A comparison of keeled and pegged anchorage systems. *Journal of biomechanical engineering*. 2000;122:430-436
38. Wahlig H, Buchholz HW. [experimental and clinical studies on the release of gentamicin from bone cement]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen*. 1972;43:441-445
39. Malchau H, Herberts P. Prognosis of total hip replacement. *The International journal of risk & safety in medicine*. 1996;8:27-45
40. Murray WR. Use of antibiotic-containing bone cement. *Clinical orthopaedics and related research*. 1984:89-95
41. Baker AS, Greenham LW. Release of gentamicin from acrylic bone cement. Elution and diffusion studies. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 1988;70:1551-1557
42. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2006;88:2487-2500
43. Duncan CP, Masri BA. The role of antibiotic-loaded cement in the treatment of an infection after a hip replacement. *Instructional course lectures*. 1995;44:305-313
44. Springer BD, Lee GC, Osmon D, Haidukewych GJ, Hanssen AD, Jacofsky DJ. Systemic safety of high-dose antibiotic-loaded cement spacers after resection of an infected total knee arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004:47-51
45. Kuhn K. *Bone cements: Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials*. Berlin.: Springer-Verlag; 2000.
46. Langlais F, Bunetel L, Segui A, Sassi N, Cormier M. [antibiotic-loaded orthopedic cements. Pharmacokinetics and bone level]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1988;74:493-503
47. Bunetel L, Segui A, Cormier M, Percheron E, Langlais F. Release of gentamicin from acrylic bone cement. *Clinical pharmacokinetics*. 1989;17:291-297

48. Bunetel L, Segui A, Cormier M, Langlais F. Comparative study of gentamicin release from normal and low viscosity acrylic bone cement. *Clinical pharmacokinetics*. 1990;19:333-340
49. Bunetel L, Segui A, Langlais F, Cormier M. Osseous concentrations of gentamicin after implantation of acrylic bone cement in sheep femora. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 1994;19:99-105
50. Wang J, Zhu C, Cheng T, Peng X, Zhang W, Qin H, Zhang X. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. *PloS one*. 2013;8:e82745
51. Elson RA, Jephcott AE, McGeachie DB, Verettas D. Antibiotic-loaded acrylic cement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1977;59:200-205
52. Hogan S, Stevens NT, Humphreys H, O'Gara JP, O'Neill E. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. *Current pharmaceutical design*. 2015;21:100-113
53. Harro C, Betts R, Orenstein W, Kwak EJ, Greenberg HE, Onorato MT, Hartzel J, Lipka J, DiNubile MJ, Kartsonis N. Safety and immunogenicity of a novel staphylococcus aureus vaccine: Results from the first study of the vaccine dose range in humans. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17:1868-1874
54. McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB. Broadly protective vaccine for staphylococcus aureus based on an in vivo-expressed antigen. *Science*. 1999;284:1523-1527
55. Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, 3rd, Goldmann DA, Pier GB. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun*. 2002;70:4433-4440
56. Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiario J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T, Lee JC. Immunization with staphylococcus aureus clumping factor b, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect Immun*. 2006;74:2145-2153
57. Abu el-Asrar AM, Shibl AM, Tabbara KF, al-Kharashi SA. Heparin and heparin-surface-modification reduce staphylococcus epidermidis adhesion to intraocular lenses. *International ophthalmology*. 1997;21:71-74
58. Speziale P, Visai L, Rindi S, Pietrocola G, Provenza G, Provenzano M. Prevention and treatment of staphylococcus biofilms. *Current medicinal chemistry*. 2008;15:3185-3195

59. Tan HL, Ao HY, Ma R, Lin WT, Tang TT. In vivo effect of quaternized chitosan-loaded polymethylmethacrylate bone cement on methicillin-resistant staphylococcus epidermidis infection of the tibial metaphysis in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:6016-6023
60. Shen SC, Ng WK, Shi Z, Chia L, Neoh KG, Tan RB. Mesoporous silica nanoparticle-functionalized poly(methyl methacrylate)-based bone cement for effective antibiotics delivery. *Journal of materials science. Materials in medicine.* 2011;22:2283-2292
61. Ayre WN, Birchall JC, Evans SL, Denyer SP. A novel liposomal drug delivery system for pmma bone cements. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 2015:n/a-n/a
62. Pavon-Djavid G, Héлары G, Migonney V. « les biomatériaux inhibiteurs de l'adhérence et de la prolifération bactérienne : Un enjeu pour la prévention des infections sur matériel prothétique ». *ITBM-RBM.* 2005;26:183-191
63. Berlot-Moirez S, Pavon-Djavid G, Montdargent B, Jozefowicz M, Migonney V. Modulation of staphylococcus aureus adhesion by biofunctional copolymers derived from polystyrene. *ITBM-RBM.* 2002;23:102-108
64. Berlot S, Aissaoui Z, Pavon-Djavid G, Belleney J, Jozefowicz M, Helary G, Migonney V. Biomimetic poly(methyl methacrylate)-based terpolymers: Modulation of bacterial adhesion effect. *Biomacromolecules.* 2002;3:63-68
65. Cremieux AC, Pavon-Djavid G, Saleh Mghir A, Helary G, Migonney V. Bioactive polymers grafted on silicone to prevent staphylococcus aureus prosthesis adherence: In vitro and in vivo studies. *Journal of applied biomaterials & biomechanics : JABB.* 2003;1:178-185

RÉSUMÉ:

La survenue d'une infection sur prothèse articulaire demeure une complication redoutable conduisant le plus souvent au changement de l'implant avec des risques de séquelles fonctionnelles et un impact socio-économique important. La lutte contre l'adhérence bactérienne au moment de la mise en place de l'implant représente une des voies de recherche pour la prévention de ces infections.

L'objectif principal de cette étude était la mise au point de ciments acryliques modifiés par l'ajout de polymères et l'analyse in vitro de leur efficacité sur l'inhibition de l'adhérence bactérienne à leur surface.

Les analyses d'adhérence bactérienne ont été réalisées avec du ciment acrylique commercialisé (CERAFIX® et CERAFIXGENTA® - société CERAVÉR – Roissy – France) associé à du polymère (polyNaSS) puis à des copolymères (MMA/NaSS) à différents dosages. La souche bactérienne testée était du *Staphylococcus aureus* en système purifié (fibrinogène seul) et en milieu plasmatique. L'ajout de polyNaSS, même en faible pourcentage, apporte au ciment un effet inhibiteur très important (entre 20 et 40% d'inhibition selon les mélanges). Les mélanges des ciments avec des copolymères MMA/ NaSS ont des propriétés d'inhibition de l'adhérence bactérienne plus faibles (environ 11%), avec un effet inhibiteur qui suit un modèle linéaire d'inhibition dépendant de la quantité de copolymère dans le mélange. Ces mélanges sont biocompatibles et ne conduisent pas à des modifications de la morphologie des ostéoblastes.

Les résultats obtenus permettent de montrer que le ciment CERAFIXGENTA® n'a pas un effet bactéricide immédiat et ne conduit pas à une inhibition de l'adhérence de bactéries sur les ciments. L'évaluation chimique a permis de préciser l'importance du relargage des polymères surtout dans les 24 premières heures indiquant un effet maximal immédiat et limité dans le temps sur l'adhérence bactérienne ce qui est l'objectif de cette prophylaxie. Ce relargage semble cependant entraîner des modifications architecturales du ciment avec augmentation de la porosité. Les observations en microscopie électronique des mélanges montrent des hétérogénéités de surfaces avec la présence des zones de porosité augmentée dues à la présence de copolymères. Ces observations semblent indiquer que bien que cette stratégie de prévention de l'infection des arthroplasties semble être très attrayante et fiable, les modifications mécaniques sur les surfaces d'implants pourraient conduire à l'échec précoce de l'arthroplastie avec descellement. L'étude biomécanique sur les différents mélanges de ciment et de polymères est nécessaire afin de préciser l'influence de la présence aussi bien du polyNaSS que des copolymères MMA/NaSS sur les qualités mécaniques du ciment. Ces

études permettront aussi de trouver le dosage optimal à obtenir pour maintenir les caractéristiques mécaniques du ciment tout en conservant les propriétés antiadhésives.

