

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 932 686**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **08 03492**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 L 27/12 (2006.01), A 61 L 27/02, 27/58**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 23.06.08.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 25.12.09 Bulletin 09/52.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS Etablissement public à caractère industriel et commercial — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : BALAGUER THIERRY, ROCHET NATHALIE, TROJANI CHRISTOPHE, BOUKHECHBA FLORIAN et CARLE GEORGES.

⑦3 Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS Etablissement public à caractère industriel et commercial.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤4 COMBINAISON DE SANG ET DE PARTICULES DE CERAMIQUE DE PHOSPHATES DE CALCIUM BIPHASES.

⑤7 Biomatériau à base de sang coagulé ou d'aspirat de moelle osseuse coagulé, et de particules de céramique de phosphates de calcium biphasés, un procédé pour sa préparation et son utilisation pour la fabrication d'un implant pour permettre la régénération du tissu osseux.

FR 2 932 686 - A1



L'invention a pour objet un nouveau biomatériau à base de sang coagulé ou d'aspirat de moelle osseuse coagulé, et de particules de céramique de phosphates de calcium biphasés, un procédé pour sa préparation et son utilisation pour la fabrication d'un implant pour permettre la régénération du tissu osseux.

5 La reconstruction des pertes de substance osseuse, d'origine principalement traumatique et plus rarement tumorale, est une des grandes difficultés rencontrées par les chirurgiens orthopédistes. Les défauts de petite taille, depuis la pseudarthrose « serrée » (défaut de consolidation d'une fracture où la perte de substance est virtuelle) jusqu'à des pertes osseuses de 5-6 cm font, le plus souvent, l'objet d'une
10 greffe autologue de tissu osseux spongieux ou cortico-spongieux prélevé sur la crête iliaque (gold standard). Les défauts de grandes tailles (≥ 6 cm) nécessitent des interventions beaucoup plus lourdes, transferts osseux vascularisés ou procédure de Masquelet. Malgré tout, la quantité d'os autologue disponible est limitée, la consolidation osseuse reste aléatoire et ces différentes techniques sont fortement pourvoyeuses de
15 complications post opératoires au niveau du site de prélèvement de la greffe.

Différents biomatériaux disponibles en pratique clinique permettent d'éviter, en théorie, les inconvénients de la greffe autologue. Malheureusement, aucun d'eux n'égale les résultats de la greffe osseuse et ils ne permettent jamais la reconstruction de pertes de substance de grande taille.

20 La majorité des substituts osseux étudiés actuellement associent aux biomatériaux des cellules souches mésenchymateuses obtenues à partir de moelle osseuse après plusieurs semaines de sélection et de culture cellulaire *in vitro*. Cette approche est lourde et coûteuse, ce qui limite les retombées cliniques.

L. Okazaki *et al.*, Clin. Oral Impl. Res., **16**, 2005, 236-243 décrit des
25 implants à base soit de poudre d'os déminéralisé, soit de sang coagulé. Plusieurs auteurs ont étudié l'association de sang avec des biomatériaux de synthèse : J. Schmid *et al.*, Clin. Oral Impl. Res. 1997;**8**:75-8 décrit des implants à base de poudre d'os de bovin déminéralisé et de sang. A. Chevrier *et al.*, Osteoarthritis and Cartilage (2007), **15**, 316-327, décrit des implants à base d'une solution de polymère contenant du chitosan dans un
30 tampon glycérol-phosphate et de sang qui coagule *in situ*. B. Wallkamm *et al.*, Clin. Oral Imp. Res., **14**, 2003, 734-742 décrit des implants à base de sang et d'un dérivé d'acide polylactique (Polyfibre® ou Polyfoam®). Yildirim M. *et al.*, Clin. Oral Impl. Res., 2000, **11**, 217-219 décrit des implants à base d'apatite bovine et de sang veineux. Le document

US 2008/0014279 décrit un biomatériau constitué d'un matériau granulaire recouvert d'un gel de polymère, et qui peut être mélangé à toute sorte de liquide, notamment du sang, pour former une pâte qui est appliquée à la spatule ou à la seringue là où un défaut osseux doit être comblé. Le document WO 02/068010 décrit un matériau composite à base de moelle osseuse, ce matériau comprenant une matrice implantable biocompatible et poreuse et un matériau coagulé, tel qu'un coagulat de moelle osseuse, de sang, de plasma.

Toutefois, aucun de ces matériaux implantables décrit dans l'art antérieur n'est dépourvu d'inconvénients :

Les matériaux nécessitant la mise en culture de cellules de moelle osseuse avant une association avec un support (os déminéralisé, polymère de synthèse ou autre) sont longs à mettre en œuvre et contraignent à faire un prélèvement de moelle osseuse sur l'individu à traiter plusieurs semaines avant la pose de l'implant, ce qui multiplie les interventions et les risques qui y sont associés.

Les biomatériaux associant un support et du sang non coagulé ne permettent pas de construire un implant.

Si l'association de certains matériaux supports avec du sang coagulé a été proposée, les résultats obtenus ne sont pas toujours satisfaisants, notamment parce que le procédé ne permet pas l'obtention d'un biomatériau homogène.

De tels matériaux résultant de l'association d'un support et de sang, coagulé ou non, ont été jusqu'à présent utilisés en chirurgie maxillo-faciale où les problèmes de consolidation osseuse sont moins critiques, mais ils ont été peu ou pas utilisés dans la réparation d'os diaphysaires.

Dans le cas de WO 02/068010, le procédé enseigné consiste à utiliser un matériau support constitué d'os déminéralisé poreux sous forme de granulés de taille minimum d'au moins 1 mm, associé à des fibres d'os cortical déminéralisé d'au moins 5 mm, et à un matériau coagulé, préférentiellement issu de moelle osseuse. Tous les exemples proposés comprennent des cellules de moelle osseuse.

L'invention permet de remédier aux inconvénients de l'art antérieur, et notamment, elle permet d'obtenir un biomatériau implantable à partir d'un support de synthèse, donc facile à produire avec des propriétés constantes et homogènes, et de sang coagulé, sans qu'il soit nécessaire de faire appel à des étapes de culture, ce matériau ayant une excellente biocompatibilité, permettant la reconstruction du tissu osseux de façon rapide. L'invention permet également l'obtention d'un os d'excellente qualité en termes de

dureté et de vascularisation. En outre le procédé de fabrication de ce biomatériau est simple, facile à mettre en œuvre, ne nécessite pas de multiples interventions sur l'individu à traiter, est peu coûteux comparativement aux procédés de l'art antérieur.

Le biomatériau de l'invention est sous forme d'une pâte qui comprend au moins un phosphate de calcium biphasé sous forme de granulés, mélangé de façon sensiblement homogène avec du sang coagulé.

Le phosphate de calcium biphasé, BCP, est utilisé dans de nombreuses applications médicales et dentaires. Le phosphate de calcium biphasé a été décrit pour la première fois comme matériau de réparation osseuse par Nery EB *et al.*, J. Periodontol. 1992 Sept., **63(9)** : 729-35. Le BCP est constitué d'un mélange d'hydroxyapatite (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et de phosphate tricalcique bêta ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (β -TCP). Sa bioactivité et sa biorésorbabilité peuvent être contrôlées par la proportion d'hydroxyapatite et de β -TCP qui le constituent.

Les biomatériaux à base de BCP ont l'avantage, par rapport aux autres biomatériaux de synthèse, de favoriser l'ostéogénèse.

Le BCP a fait l'objet de nombreuses études : Fella B.H. *et al.*, J. Mater. Sci. : Mater. Med. (2007), **18**, 287-294, ont montré que le choix d'une granulométrie inférieure à 20 μm favorisait la réponse inflammatoire des tissus, ce qui pourrait expliquer le fait que cette taille de particules soit particulièrement favorable à l'ostéogénèse, comme observé par Malard O. *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., **46(1)**, 1999, 103.

Mankani M.H. *et al.*, Biotechnology and Bioengineering, **72(1)**, 2001, 96-107, ont au contraire montré que les particules de BCP calibrées d'une taille allant de 100 à 250 μm étaient celles qui entraînaient la plus importante reconstruction osseuse lorsqu'elles sont associées à des cellules de moelle osseuse cultivées, tandis qu'aucune formation osseuse n'était observée en dessous de 44 μm , et que de bons résultats sont obtenus avec des particules de taille allant jusqu'à 2 mm.

Trojani C. *et al.*, Biomaterials, **27**, 2006, 3256-3264, ont montré qu'une bonne ostéoinduction pouvait être obtenue par l'implantation d'un matériau composite BCP/hydrogel de Si- hydroxypropylméthyl cellulose auquel ont été additionnées des cellules de moelle osseuse cultivées, avec des particules de BCP calibrées de 40 à 80 μm .

Ces deux derniers procédés requièrent cependant une étape de prélèvement de cellules de moelle osseuse ainsi que leur mise en culture.

La présente invention se fonde sur les faits suivants :

- l'observation par les inventeurs que le BCP était doté de propriétés anticoagulantes,

- l'observation par les mêmes inventeurs qu'un BCP avec une granulométrie choisie associé à du sang coagulé, ou à un aspirat de moelle osseuse coagulé, permet d'obtenir une très bonne ostéogenèse et conduit à un tissu osseux de qualité très satisfaisante, à l'aide d'un procédé d'une très grande simplicité par rapport à ceux de l'art antérieur.

L'invention a donc pour premier objet l'association d'un BCP particulier défini ci-dessous avec du sang coagulé ou avec un aspirat de moelle osseuse coagulé. De façon avantageuse, cette association est sous forme d'une pâte homogène malléable.

Cette pâte peut être manipulée pour l'adapter à la taille et à la forme du défaut à combler, tout en veillant à ne pas lui appliquer de pressions excessives qui endommageraient ou détruiraient sa structure tridimensionnelle.

Le BCP utilisé dans la présente invention présente une granulométrie comprise entre 40 et 500 μm , préférentiellement entre 40 et 400 μm , encore plus préférentiellement entre 40 et 300 μm , et avantageusement entre 80 et 200 μm .

Le BCP utilisé dans l'invention consiste en un fritté haute température, broyé et calibré, par exemple par tamisage, en granulés de diamètre choisi. De façon avantageuse le BCP utilisé dans l'invention comporte de l'hydroxyapatite et du phosphate tri calcique β dans un rapport en poids/poids HA/ β -TCP compris entre 5/95 et 95/5, de préférence entre 30/70 et 80/20, avantageusement entre 40/60 et 60/40.

Avantageusement il s'agit d'un BCP poreux, avec des tailles de pores allant de 50 nm à 150 μm , préférentiellement de 1 μm à 50 μm .

Les granulés ou la poudre de phosphate tri calcique et d'hydroxyapatite peuvent être obtenus conformément aux méthodes décrites par Bouler *et al.*, J Biomed Mater Res, 1996, **32**, 603-609 ; Bouler *et al.*, J Biomed Mater Res, 2000, **51**, 680-684 ; Obadia *et al.*, J Biomed Mater Res, 2006, **80(B)**, 32-42. Ils sont disponibles commercialement auprès de la société GRAFTYS SARL.

Si l'on applique les procédés de l'art antérieur au granulat de BCP, c'est-à-dire si l'on mélange le BCP avec un échantillon sanguin par exemple, on n'obtient pas de coagulat de sang car le BCP est doté de propriétés anticoagulantes. Selon le procédé de l'invention, le BCP est mélangé à un échantillon de sang préalablement prélevé sur anticoagulant ou prélevé sans anticoagulant et mis immédiatement au contact du BCP chez

un donneur compatible avec le receveur du biomatériau, puis au moins un agent coagulant est additionné au mélange sous agitation. De préférence l'agent coagulant est un dérivé du calcium. Avantagement l'agent coagulant à base de calcium est choisi parmi les sels de calcium biocompatibles comme CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{AcOEt})_2$, CaSO_4 .

5 Parmi les autres agents coagulants utilisables pour la mise en œuvre de l'invention on peut citer la thrombine. Le mélange de BCP, de sang, ou d'aspirat de moelle, et d'agent coagulant est poursuivi pendant toute l'étape de coagulation et est d'une intensité adaptée pour permettre la formation d'un mélange homogène de granulés ou de particules de BCP et de sang coagulé, ou de moelle coagulée, et notamment le maintien en
10 suspension des particules de BCP. Si cette agitation est trop ou pas assez forte, elle ne permet pas l'obtention d'un mélange homogène. L'homme du métier peut contrôler visuellement la formation d'un mélange homogène.

 Outre le BCP, la composition du biomatériau peut comprendre des additifs éventuels tels que : polymères, particules de céramiques, molécules
15 pharmaceutiques, les conditions pour l'emploi de ces matériaux étant : leur biocompatibilité, l'absence d'effet négatif sur la réaction de prise du biomatériau. De tels additifs bien connus de l'homme du métier sont destinés à modifier la rhéologie du biomatériau, son comportement *in vivo* (dureté, résorption, ostéogenèse) ou à agir sur l'apparition d'infections ou de phénomènes inflammatoires (antibiotiques, anti-infectieux,
20 agents anti-inflammatoires).

 On peut aussi prévoir d'introduire dans le biomatériau de l'invention des principes actifs, tels que des molécules thérapeutiques comme des molécules destinées à prévenir ou traiter une pathologie choisie par exemple parmi : un cancer, l'ostéoporose.

 On peut également introduire dans le biomatériau de l'invention des
25 facteurs de croissance, naturels ou de synthèse. On peut aussi prévoir la présence de biomarqueurs ou d'agents de contraste qui favorisent la visualisation par imagerie médicale de la résorption du biomatériau et son devenir dans l'organisme.

 On peut prévoir d'introduire dans le biomatériau de l'invention du tissu adipeux, ou toute autre préparation de tissu ou de cellules, prélevé chez le patient auquel
30 est destiné le biomatériau, ce tissu ou cette préparation ayant été préalablement mis en suspension dans du sang ou dans du plasma ou dans du sérum physiologique. Parmi les préparations tissulaires ou cellulaires on peut citer du tissu adipeux, des plaquettes, des cellules de moelle osseuse.

On peut aussi prévoir la présence de BCP de granulométrie différente, mais de préférence en petite quantité, avantageusement < 5% en poids/poids total de BCP, car il a été constaté que le contrôle de la granulométrie permettait une meilleure formation de tissu osseux (plus rapide, de meilleure qualité), et une bonne résorption.

5 Selon le procédé de l'invention, le BCP est placé dans une cavité d'un récipient fermé et stérile comme la cavité intérieure d'une seringue. Du sang ou de l'aspirat de moelle osseuse, préalablement prélevé sur un donneur compatible avec le receveur est introduit dans ce récipient.

10 Si le sang ou l'aspirat de moelle osseuse prélevé doit être stocké pendant une durée supérieure à quelques secondes (5 à 10 secondes), il est mélangé aussitôt après son prélèvement avec un anticoagulant afin d'éviter sa coagulation prématurée. Le sang du donneur peut par exemple être prélevé directement dans un tube contenant la quantité appropriée d'agent anticoagulant.

15 L'anticoagulant peut être un chélateur des ions calcium, comme par exemple du citrate de sodium, mais aussi de l'héparine par exemple.

Le mélange de BCP et de sang ou de moelle osseuse est effectué dans les proportions préférentielles suivantes :

20 de 10 à 90% en poids de BCP par rapport au volume de sang (ou de moelle osseuse), de préférence de 20 à 80%, et encore plus préférentiellement de 30 à 70%, en g/ml.

25 De façon avantageuse, le sang est prélevé chez le receveur lui-même de façon à garantir au mieux la biocompatibilité de l'implant. Selon une variante de l'invention le sang est remplacé par un produit dérivé du sang tel que du plasma. De préférence on utilise du sang total. Dans toute la demande y compris dans les revendications, lorsque l'on utilise le mot sang, on inclut dans sa définition les produits dérivés du sang tels que le plasma.

De façon préférentielle, dans la mise en œuvre de l'invention, on utilise du sang ou du plasma, dont le prélèvement ne nécessite pas une intervention chirurgicale.

30 Suivant une variante de l'invention, le sang peut être prélevé à l'aide d'une seringue dans le corps de laquelle a été préalablement placé le BCP et éventuellement des additifs.

Après un premier mélange du BCP et du sang, l'agent coagulant est, lui aussi, additionné au mélange, par exemple par aspiration à l'aide de la seringue si l'on a utilisé un tel dispositif.

Le récipient clos contenant le BCP, le sang et l'agent coagulant est aussitôt agité, de façon à permettre la formation d'un matériau homogène. Par exemple, si l'on effectue le mélange dans un tube ou dans le corps d'une seringue, on place le récipient dans un agitateur rotatif dont la vitesse est réglée en fonction de la granulométrie du BCP, de façon à ce que les particules de BCP restent en suspension pendant que se produit la coagulation. Selon une variante de l'invention, l'agitation peut être produite par des billes aimantées associées à un agitateur magnétique.

A l'issue de cette étape, le mélange est sous forme d'une pâte malléable, homogène, comportant un réseau tridimensionnel de fibrine emprisonnant des particules sanguines, du plasma et les autres molécules qui ont été introduites dans la composition.

Suivant le type de dispositif qui a été employé pour la préparation du biomatériau de l'invention celui-ci peut ensuite être appliqué à l'aide des moyens les plus adaptés à l'emplacement où un défaut osseux doit être comblé :

A l'aide d'un outil tel qu'une spatule sans toutefois perturber l'organisation tridimensionnelle de l'implant, ou à l'aide de la seringue ou d'un autre dispositif cylindrique dont l'extrémité aura été préalablement sectionnée pour former une ouverture adaptée à la rhéologie du biomatériau de l'invention.

Ainsi, un autre objet de l'invention est un procédé pour la fabrication d'un biomatériau, ce procédé comportant au moins les étapes suivantes :

(i) mélange d'un BCP sous forme de granulés de taille comprise entre 40 et 500 μm avec du sang, ou avec un aspirat de moelle osseuse, en proportions allant de 10 à 90% en poids de BCP par volume de sang ou de moelle,

(ii) ajout au mélange de l'étape (i) d'au moins un agent coagulant en quantité suffisante pour provoquer la coagulation (du sang ou de la moelle),

(iii) mélange dans des conditions favorisant l'homogénéisation du BCP pendant que se produit la coagulation.

Comme cela a déjà été évoqué, dans le procédé de l'invention, les étapes (i) à (iii) peuvent être mises en œuvre dans la cavité interne d'une seringue ou dans un tube fermé à ses extrémités. L'agent coagulant peut être choisi parmi les dérivés du calcium,

tels ceux qui ont été énumérés ci-dessus, ou parmi les autres agents coagulants tels que la thrombine par exemple.

L'invention a encore pour objet un procédé de comblement d'un défaut osseux ce procédé comportant les étapes énumérées ci-dessus et comportant en outre une
5 étape d'application du biomatériau obtenu à l'étape (iii) dans l'espace où un défaut osseux a été constaté. Ce procédé peut en outre comprendre des étapes d'incision de tissu et de suture.

Suivant la taille et la configuration du défaut osseux, le comblement par le biomatériau de l'invention peut être associé à une ostéosynthèse qui permet de conférer
10 au tissu atteint la résistance mécanique nécessaire pendant que se produit la reconstruction osseuse sur le site d'implantation du biomatériau de l'invention.

Comme les inventeurs l'ont constaté, l'implantation du biomatériau de l'invention a permis d'induire la formation de tissu osseux dans des délais courts (quelques semaines), ce tissu osseux étant très richement vascularisé.

Au contraire, il a été constaté que l'implantation d'un biomatériau obtenu
15 par le même procédé avec un BCP de granulométrie inférieure à 40 μm ne permettait pas d'obtenir de formation de tissu osseux de qualité satisfaisante et dans des délais satisfaisants. Et l'implantation d'un biomatériau obtenu par le même procédé avec un BCP de granulométrie supérieure à 500 μm conduit à un implant dont la résorbabilité est moins
20 bonne.

Un autre objet de l'invention est constitué par un kit pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, ce kit comprenant l'association d'un BCP de granulométrie comprise entre 40 et 500 μm , de préférence entre 40 et 400 μm ,
25 avantageusement entre 40 et 300 μm et encore plus préférentiellement de 80 à 200 μm , avec au moins un agent coagulant. De préférence l'agent coagulant est dérivé du calcium. Avantageusement l'agent coagulant est CaCl_2 .

La quantité d'agent coagulant est calculée pour compenser l'effet anticoagulant du BCP et éventuellement de l'agent anticoagulant qui est associé au sang prélevé.

La concentration en agent coagulant dans le mélange de sang et de BCP
30 doit de préférence être comprise entre 1 et 50 mM, encore plus préférentiellement entre 3 et 35 mM, en particulier dans le cas où l'agent coagulant est à base de calcium. On doit

préférentiellement ajouter l'agent coagulant en solution aqueuse de façon à ne pas dépasser 2 volumes de solution d'agent coagulant par poids de BCP en ml/g.

La concentration de la solution d'agent coagulant peut varier de façon à respecter ces deux contraintes, et en utilisant de préférence une solution d'agent coagulant
5 de concentration inférieur à 120 mM, notamment lorsque l'agent coagulant est un sel de calcium.

Si le sang est prélevé sur anticoagulant il faut compenser l'effet de l'agent anticoagulant et l'effet du biomatériau.

Par exemple, pour du sang prélevé sur citrate de sodium dans des
10 conditions classiques (de marque Vacuette®, disponibles auprès de la société Greiner Bio-One, ou de marque Vacutainer®, disponibles auprès de la société Becton Dickinson) et dans les proportions de 50 mg de BCP et 100 µl de sang, nous ajoutons 1/5^{ème} du volume final (soit 20 µl) d'une solution de calcium à 80 mM (concentration finale 13,3 mM). La concentration de la solution peut aller jusqu'à 120 mM. Au-delà, on peut être en excès de
15 calcium, ce qui inhibe à nouveau la coagulation.

Si le sang n'est pas prélevé sur anticoagulant, le sang est prélevé directement sur le biomatériau et le calcium est ajouté secondairement. Dans ce cas, on peut ajouter 1/5^{ème} du volume de sang d'une solution aqueuse de sel de calcium de concentration allant de 12 mM à 60 mM environ.

20 Une telle association peut être sous la forme d'un kit stérile comportant :
(a) un dispositif comportant une cavité intérieure stérile dans lequel est placé le BCP,
(b) un réservoir stérile comportant l'agent coagulant.

Le réservoir (b) peut faire partie du dispositif (a) ou être une entité
25 distincte telle qu'un tube ou un flacon dans lequel on peut prélever l'agent coagulant pour le transférer dans la cavité intérieure du dispositif (a), ou une seringue permettant l'injection de l'agent coagulant dans la cavité où est placé le BCP.

Avantageusement le dispositif (a) comporte des moyens permettant
l'introduction de sang dans la cavité interne : par exemple des moyens permettant le
30 prélèvement d'un échantillon de sang soit directement sur un individu, soit à partir d'un réservoir, ou des moyens permettant l'injection d'un échantillon de sang dans la cavité intérieure de façon à permettre le mélange avec le BCP. On peut prévoir que le sang prélevé soit directement introduit dans la cavité comprenant le BCP ou qu'il soit prélevé dans le réservoir où est placé l'anticoagulant puis que l'ensemble soit transféré dans la
35 cavité où se trouve le BCP. Dans le cas où l'on utilise un aspirat de moelle osseuse, on prévoit un moyen d'aspiration de la moelle osseuse.

La cavité intérieure du dispositif (a) est d'une taille permettant d'y introduire la quantité de sang ou de moelle nécessaire pour produire le biomatériau de l'invention, ainsi que les autres constituants du mélange tels que : agent coagulant, principes actifs, préparations de tissu ou de cellules.

5 De façon avantageuse également le dispositif (a) comporte des moyens permettant l'application du biomatériau dans la zone où un défaut osseux a été constaté.

Un tel dispositif peut être constitué d'un dispositif cylindrique tel qu'un tube ou une seringue comme cela est illustré dans la partie expérimentale.

On peut également prévoir d'utiliser un dispositif tel que celui décrit dans
10 WO 02/068010 comportant un tube à l'intérieur duquel est conservé le BCP, dans lequel on injecte le sang et l'agent coagulant et qui peut se voir adapter un piston pour restituer le biomatériau une fois que celui-ci est formé.

On peut encore prévoir d'utiliser un dispositif du type Vacutainer®, c'est-à-dire des tubes sous vide auxquels on adapte une seringue permettant de faire un
15 prélèvement d'une quantité prédéterminée de sang, ces tubes étant pré-conditionnés avec du BCP dans leur cavité interne.

Un autre objet de l'invention est constitué par un biomatériau implantable comportant un BCP sous forme de granules dont la taille a été définie ci-dessus, dispersé de façon sensiblement homogène dans un réseau tridimensionnel de
20 protéines sanguines ou dans un réseau de protéines de moelle osseuse.

Avantageusement ce biomatériau comporte un BCP tel que défini ci-dessus et un coagulat de protéines sanguines (ou de moelle) sous forme d'un mélange sensiblement homogène ayant l'aspect d'une pâte malléable.

Par pâte malléable on entend une matière qui ne s'écoule pas d'elle-même, comme le ferait un liquide, mais dont la résistance mécanique est suffisamment
25 faible pour pouvoir être modelée sous l'effet d'une pression exercée manuellement par un individu, éventuellement à l'aide d'un instrument tel qu'une spatule ou le piston d'une seringue.

Un tel biomatériau peut être utilisé pour la fabrication d'un implant
30 osseux, qu'il s'agisse de combler une fracture, une perte de substance d'origine traumatique ou tumorale, un défaut consécutif à une intervention chirurgicale, ou d'aider à la mise en place d'une prothèse.

Le biomatériau peut être introduit, comme illustré dans les exemples, par une intervention chirurgicale dans la zone où un défaut osseux doit être comblé. Après incision, le biomatériau est implanté et l'incision est refermée.

5 Le biomatériau de l'invention peut être associé à une ostéosynthèse de résistance mécanique plus élevée, de façon à permettre la stabilité du montage en attendant la colonisation de la zone déficiente par les tissus osseux.

On peut prévoir de l'associer à une prothèse. Un enrobage de la prothèse par le biomatériau de l'invention permet de favoriser l'implantation de tissu osseux vivant dans ou autour de la prothèse.

10 Le biomatériau de l'invention peut encore être utilisé *in vitro* ou *ex-vivo* comme support pour la production de tissu osseux :

En effet, la culture de cellules osseuses autour de ce biomatériau permet de produire un tissu osseux ultérieurement implantable.

15 Un autre objet de l'invention est l'utilisation *in vitro* ou *ex-vivo* d'un biomatériau tel que décrit ci-dessus pour produire un implant osseux.

On peut, selon l'invention cultiver des cellules osseuses sur le biomatériau de l'invention dans un moule ayant la forme de l'implant que l'on souhaite fabriquer. La culture de cellules dans ces conditions permet d'obtenir un implant biocompatible de forme et de dimensions adaptées.

20 **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

Figures

Figure 1 : Formation de tissu osseux par un implant de sang coagulé autour de particules de BCP.

25 Coupes transversales d'implants colorés au HES après 4 semaines d'implantation en site sous-cutané (A et C) et intramusculaire (B et D).

Echelle : A et B : 500 μm

C et D : 50 μm

Flèches blanches : ostéoblastes

Flèches noires : ostéocytes

30 Têtes de flèches noires : vaisseaux sanguins

Tête de flèche blanches : ostéoclastes

Figure 2 : Coupe d'implants sang/BCP après 4 semaines d'implantation.

(A) : hybridation par du sérum immun montrant la coloration brune d'ostéocalcine dans le cytoplasme des cellules (flèche blanche)

(B) : hybridation par du sérum non immun - Echelle : 10µm

(C) : Coloration Goldner - Echelle : 50 µm

5 Flèches noires : vaisseaux et ostéocytes.

Figure 3 : Microscopie électronique à balayage d'implants sang/BCP de 4 semaines

(A) matrice de collagène dans l'espace intergranulaire – Echelle : 10 µm

(B) grossissement de (A) – Echelle : 1 µm

10 (C) deux ostéoclastes attachés aux granules avec 2 à 3 noyaux visibles – Echelle : 10 µm

(D) capillaire fonctionnel – Echelle : 10 µm

Figure 4 : Microscopie électronique à balayage d'implants

(A) BCP/sang coagulé

15 (B) BCP/plasma coagulé

Echelle : 1 µm

Figure 5 : Formation de tissu osseux à partir d'implants BCP/plasma après 4 semaines d'implantation

Sites sous-cutanés (A, C)

20 Sites intramusculaires (B, D)

Echelle : 500 µm (A, B)

50 µm (C, D)

1. Principe :

25 Il s'agit d'une procédure extemporanée, réalisée au bloc opératoire. Elle consiste à mélanger dans le corps d'une seringue en polypropylène des particules de BCP et du sang total autologue (50% w/v) prélevé sur un anticoagulant chélateur des ions calcium. L'ajout de CaCl₂ permet de déclencher la coagulation. La seringue est alors placée pendant 10 minutes à température ambiante sur un mélangeur rotatif, ce qui permet de maintenir les particules de BCP en suspension dans le sang au fur et à mesure de la

30 coagulation. On obtient ainsi une répartition homogène des particules au sein du sang coagulé. L'extrémité de la seringue est alors sectionnée et l'implant poussé hors de la seringue à l'aide du piston pour être placé dans le site d'implantation.

Résultats obtenus chez l'animal (souris C57BL/6) :

sang/BCP et un implant de plasma/BCP à chaque site. Après 4 à 8 semaines, les animaux sont sacrifiés par inhalation de CO₂ et les implants prélevés pour analyse.

2.3. Analyse histologique :

Les implants disséqués sont fixés pendant 24 heures dans une solution de formaline tamponnée à 10%. Chaque implant est ensuite sectionné en trois tranches qui sont décalcifiées ou non dans une solution de 10% (w/v) d'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) pendant 24 heures à température ambiante puis incluses en paraffine. Des sections de 4 µm sont réalisées, déparaffinées, hydratées et colorées à l'Hématoxyline, Erythrosine, Safran (HES). Les coupes sont ensuite observées en microscopie optique grâce à un microscope Zeiss Axioskop. Les photos sont réalisées grâce à une caméra couleur AxioCam HRc (Zeiss, Le Pecq, France). Afin de quantifier les surfaces occupées par l'os fibrillaire d'une part et par les particules de BCP d'autre part, chaque image d'implant a été subdivisée en trois zones de surface égale à 0,6 mm² selon l'axe médian de l'implant. Dans chacune de ces trois zones, l'aire occupée par le tissu osseux fibrillaire a été mesurée en utilisant le logiciel AxioVision Rel.4.6. Cette analyse a été effectuée pour trois implants SC et trois implants IM. Le nombre de vaisseaux et d'ostéoclastes a été évalué dans ces mêmes zones en comptant respectivement les capillaires et les cellules géantes multinucléées au microscope optique (100X) par deux observateurs différents. La densité en ostéoclastes et en vaisseaux est exprimée par mm² sous forme de moyenne ± déviation standard. Le test statistique utilisé est le test T de Student. La significativité a été définie pour une valeur de p inférieure à 0,05.

2.4. Coloration Goldner :

Des coupes d'implants non décalcifiées de 7 µm d'épaisseur ont été colorées par la méthode Trichrome de Goldner qui permet d'évaluer la minéralisation du tissu osseux et de distinguer le tissu minéralisé (en bleu/vert) du tissu ostéoïde non minéralisé (en rouge). Brièvement, les sections déparaffinées sont réhydratées puis incubées en présence d'hématoxyline de Weigert pendant 20 min, rincées à l'eau courante et différenciées en présence d'alcool acide à 1%, lavées à l'eau courante pendant 5 min puis rincées à l'eau distillée. Les sections sont ensuite colorées par incubation dans une solution de Ponceau de xylydine/acide fuchsique/azophloxine/acide acétique pendant 5 min, rincées en acide acétique 1%, incubées en présence d'acide phosphomolybdique/orange G pendant 20 min, rincées en acide acétique 1%, colorées en présence de vert lumière/acide acétique

pendant 5 minutes, lavées en 1% acide acétique pendant 5 minutes, séchées et montées en milieu de montage Entellan (Merck, Damstadt, Allemagne).

2.5. Immunohistochimie de l'ostéocalcine murine

Nous avons utilisé un anticorps polyclonal immunopurifié anti-ostéocalcine de souris, dirigé contre un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 1-20 de l'extrémité N terminale de la protéine (Alexis Biochemicals, Lausanne, Suisse). Brièvement, des coupes en paraffine de 7µm ont été déparaffinées, réhydratées en éthanol, lavées en PBS et incubées 30 minutes en présence de H₂O₂ à 0,3% dans du PBS. Après deux lavages en PBS, les lames ont été incubées en présence de sérum de chèvre à 1,5% (tampon de blocage) pendant 30 min. Après lavage en PBS, l'incubation en présence d'un anticorps anti-immunoglobulines de lapin marqué à la biotine et la procédure de révélation à la peroxydase ont été réalisées en utilisant le kit de marquage ABC (sc-2118, Santa Cruz, CA, USA). Les sections ont été ensuite incubées en présence du substrat de la peroxydase pendant 10 min et les noyaux cellulaires colorés à l'hématoxyline pendant 3 min. Après déshydratation, le montage est réalisé en liquide de montage Entellan (Merck). Les contrôles sont réalisés en incubant les lames en présence de tampon de blocage.

2.6. Microscopie électronique à balayage

Les implants constitués de sang coagulé / BCP ou de plasma coagulé/BCP, avant et après quatre semaines d'implantation, ont été fixés pendant 12 heures à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde tamponnée. Les échantillons ont été ensuite lavés et incubés en présence de glycérol à 30% pendant 1h puis congelés dans l'azote liquide et fracturés. Après déshydratation en présence de concentrations croissantes d'éthanol, ils ont été immergés dans l'hexaméthylidisilazane (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) pendant 5 min puis séchés à température ambiante. Ils ont ensuite été fixés sur des supports en aluminium puis recouverts d'une couche d'orpalladium (Polaron E5100, UK). L'observation a ensuite été réalisée grâce à un microscope électronique à balayage de type JEOL 6700F (Japon).

3. Résultats

3.1. Analyse macroscopique et microscopique des implants sous-cutanés et intramusculaires de sang coagulé / BCP.

L'implantation de sang coagulé en absence de particules de BCP, n'a pas permis la formation d'un tissu osseux. Après quatre semaines, nous avons retrouvé uniquement une petite quantité de tissu fibreux au site d'implantation.

La dissection et l'examen macroscopique des implants de sang coagulé autour des particules de BCP après 4 et 8 semaines ont permis de constater leur consistance ferme ainsi que la présence de nombreux petits vaisseaux à leur surface. Aucune inflammation du tissu hôte n'a été observée.

5 L'analyse histologique des coupes en paraffine d'implants de sang / BCP après 4 semaines d'implantation a révélé une colonisation complète et reproductible de tout l'espace inter particulaire par du tissu osseux immature en contact étroit avec le BCP, à la fois pour les implants SC (Fig. 1A) et IM (Fig. 1B). L'observation à plus fort grossissement suggère que la matrice de collagène est plus mature en site IM (Fig. 1D) qu'en site SC (Fig. 10 1C). Pour évaluer la quantité d'os fibrillaire développée dans l'espace inter particulaire, la proportion entre les aires occupées par le tissu osseux et les aires occupées par le BCP a été calculée comme décrit dans les matériels et méthodes. Ceci a permis de montrer une différence significative entre les sites SC et IM avec $49,63 \pm 5,08$ % de tissu osseux dans les implants IM et $42 \pm 8,33$ % dans les implants SC ($n = 9$, $p = 0,035$). L'ensemble de ces 15 résultats indique que l'espace inter particulaire est complètement colonisé dans les deux sites SC et IM, mais que la quantité de tissu développée est significativement plus grande dans les implants IM.

A chacun des sites, nous avons observé la présence de nombreux vaisseaux au sein de la matrice collagénique, répartis de façon homogène dans tous les 20 implants (Fig 1C, D, têtes de flèches noires). Leur numération a révélé une différence significative entre les implants IM et SC avec une moyenne de $61,4 \pm 10,2$ vaisseaux / mm^2 et $51,10 \pm 10$ / mm^2 respectivement ($n = 9$; $p = 0,045$). Nous avons également observé de nombreuses cellules géantes multinucléées attachées aux particules de BCP (têtes de 25 flèches blanches). Ces cellules sont identiques à celles que nous avons identifiées comme étant des ostéoclastes dans un travail précédent (Trojani C. et *al.*, *Biomaterials*, 27, 2006, 3256-3264). Leur numération a révélé une moyenne de $88,51 \pm 14,60$ ostéoclastes / mm^2 dans les implants IM et de $93,13 \pm 14,40$ / mm^2 dans les implants SC, différence non statistiquement significative. La forte capacité de résorption de ces cellules est fortement 30 suggérée par la présence de micro particules et de cristaux de fragmentation intercytoplasmiques, par l'irrégularité du contour de certaines particules de BCP, leur texture de dégradation avec une densité plus basse et hétérogène. Enfin, nous avons observé la présence d'ostéoblastes cubiques alignés à la surface des particules de BCP (Fig. 1C et insert, Fig. 5C, flèches blanches) et de nombreuses cellules de type ostéocytaires

incluses dans la matrice de collagène (Fig. 1D, 2B, 3A, B flèches noires). Le phénotype d'ostéoblaste mature de ces cellules a été démontré par la détection immunohistologique intracytoplasmique de l'ostéocalcine (Fig. 2A). De plus, tous les implants étaient positifs après coloration Goldner après 4 semaines d'implantation ce qui indique que ce tissu
5 néoformé est minéralisé (Fig. 2C).

L'analyse des implants IM de 4 semaines en microscopie électronique à balayage a permis d'observer (Fig. 3) la microporosité des particules de BCP, la matrice de collagène remplissant les espaces inter particulaires, la présence de capillaires fonctionnels contenant des érythrocytes (Fig. 3A, D, flèche blanche) et d'ostéoclastes attachés aux
10 granules de BCP (Fig. 3C, flèches noires). De plus, elle a confirmé la présence de cellules de type ostéocytaire, étoilées, possédant de nombreux prolongements irradiant dans toutes les directions, incluses dans la matrice de collagène et entourées par un espace péricellulaire de type ostéoplaste (Fig. 3A insert, 3B).

Les résultats obtenus après 8 semaines d'implantation n'ont pas révélé de
15 différence significative avec les implants de 4 semaines. Tous les implants SC et IM sont entièrement colonisés par de l'os immature présentant les mêmes caractéristiques histologiques.

3.2. Analyse macroscopique et microscopique des implants SC et IM de plasma coagulé / BCP :

20 Afin d'analyser le rôle respectif du plasma et des cellules sanguines dans la néoformation osseuse nous avons implanté en parallèle pour chaque souris et à chaque site (SC et IM) un implant de sang coagulé / BCP et un implant de plasma coagulé / BCP.

La structure du réseau de fibrine des deux types d'implant, sang coagulé / BCP et plasma coagulé / BCP, a été analysée en microscopie électronique à balayage. Ceci
25 a montré que la maille de fibrine obtenue avec le sang coagulé était plus large que celle observée avec le plasma coagulé (Fig. 4A, B). Comme attendu, les globules rouges et les plaquettes sont les cellules prédominantes observées dans les implants de sang coagulé / BCP. La conservation de leur forme et de leur structure démontre une bonne viabilité (Fig 4A), ce qui indique que le mélange de sang et de particules de BCP n'a pas d'effet délétère
30 sur les cellules sanguines.

La dissection et l'examen macroscopique des implants de plasma coagulé / BCP après 4 et 8 semaines a révélé des caractéristiques similaires à celles des implants de sang coagulé / BCP *i.e.* une consistance ferme et de nombreux vaisseaux de surface visibles

(résultats non montrés). L'analyse histologique après 4 semaines a montré que les implants SC étaient tous colonisés à 80% environ (Fig 5A) par de l'os néoformé. L'analyse des implants IM a révélé une colonisation totale dans 75 % des cas (Fig. 5B) et dans 25% des cas, la présence d'une petite zone centrale de tissu plus fibreux et lâche (résultat non montré). Dans chacun des sites, le tissu osseux fibrillaire néoformé présentait les mêmes caractéristiques que celles du tissu obtenu dans les implants de sang coagulé / BCP (Fig 5C, 5D). En conclusion, ces résultats démontrent que l'utilisation du sang total permet d'obtenir une colonisation complète des implants dans les deux sites. L'association de plasma coagulé et de particules de BCP engendre une colonisation non complète.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la fabrication d'un biomatériau ce procédé comportant au moins les étapes suivantes :

5 (i) mélange d'un phosphate de calcium biphasé, ou BCP, sous forme de granulés de taille comprise entre 40 et 500 μm avec du sang, ou avec un aspirat de moelle osseuse, en proportions allant de 10 à 90% en poids de BCP par volume de sang ou de moelle, en g/ml,

(ii) ajout au mélange de l'étape (i) d'au moins un agent coagulant en quantité suffisante pour provoquer la coagulation du sang ou de la moelle,

10 (iii) mélange dans des conditions favorisant l'homogénéisation du BCP pendant que se produit la coagulation.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'agent coagulant à base de calcium est choisi parmi : les sels de calcium biocompatibles et de préférence CaCl_2 .

15 3. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le sang a été préalablement prélevé chez un donneur compatible avec le receveur auquel est destiné le biomatériau.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le sang a été préalablement prélevé chez le receveur auquel est destiné le biomatériau.

20 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le mélange du BCP, du sang et de l'agent coagulant est poursuivie pendant toute l'étape de coagulation et est d'une intensité adaptée pour permettre le maintien en suspension des particules de BCP pendant la coagulation.

25 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les étapes (i) à (iii) sont mises en œuvre dans la cavité interne d'une seringue ou dans un tube fermé à ses extrémités.

7. Biomateriau susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 comprenant un BCP sous forme de granulés de taille comprise entre 40 et 500 μm et du sang coagulé ou de la moelle coagulée.

30 8. Biomateriau selon la revendication 7 sous forme d'une pâte homogène malléable.

9. Biomateriau selon l'une quelconque des revendications 7 et 8 dans lequel les granulés de BCP ont une taille allant de 80 à 200 μm .

10. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 dans lequel le BCP comporte de l'hydroxyapatite (HA) et du phosphate tri calcique β (β -TCP) dans un rapport en poids/poids HA/ β -TCP compris entre 5/95 et 95/5.
11. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 et
5 comprenant en outre au moins un additif choisi parmi : des polymères, des particules de céramiques, des molécules pharmaceutiques, des facteurs de croissance, naturels ou de synthèse, des biomarqueurs, des agents de contraste, des préparations de tissu ou de cellules.
12. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 7 à 11
10 comportant un réseau tridimensionnel de fibrine.
13. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 7 à 12 pour son utilisation comme implant dans un procédé de comblement d'un défaut osseux.
14. Association d'un biomatériau selon l'une quelconque des revendications 7 à 13 avec une ostéosynthèse.
15. Kit pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ce kit comprenant l'association d'un BCP de granulométrie comprise entre 40 et 500 μm avec un agent coagulant dérivé du calcium.
16. Kit selon la revendication 15 dans lequel l'agent coagulant est CaCl_2 .
17. Kit selon l'une quelconque des revendications 15 et 16 qui comporte :
20 (a) un dispositif comportant une cavité intérieure stérile dans lequel est placé le BCP,
(b) un réservoir stérile comportant l'agent coagulant.
18. Kit selon l'une quelconque des revendications 15 à 17 dans lequel le dispositif (a) comporte des moyens permettant l'introduction de sang dans la cavité
25 intérieure.
19. Kit selon l'une quelconque des revendications 15 à 18 dans lequel le dispositif (a) comporte des moyens permettant l'application du biomatériau dans la zone où un défaut osseux a été constaté.
20. Kit selon l'une quelconque des revendications 15 à 19 dans lequel le
30 dispositif (a) est constitué d'une seringue.
21. Utilisation d'un biomatériau selon l'une quelconque des revendications 7 à 14 *in vitro* ou *ex-vivo* comme support pour la production de tissu osseux.

22. Utilisation d'un biomatériau selon l'une quelconque des revendications 7 à 14 *in vitro* ou *ex-vivo* pour produire un implant osseux.

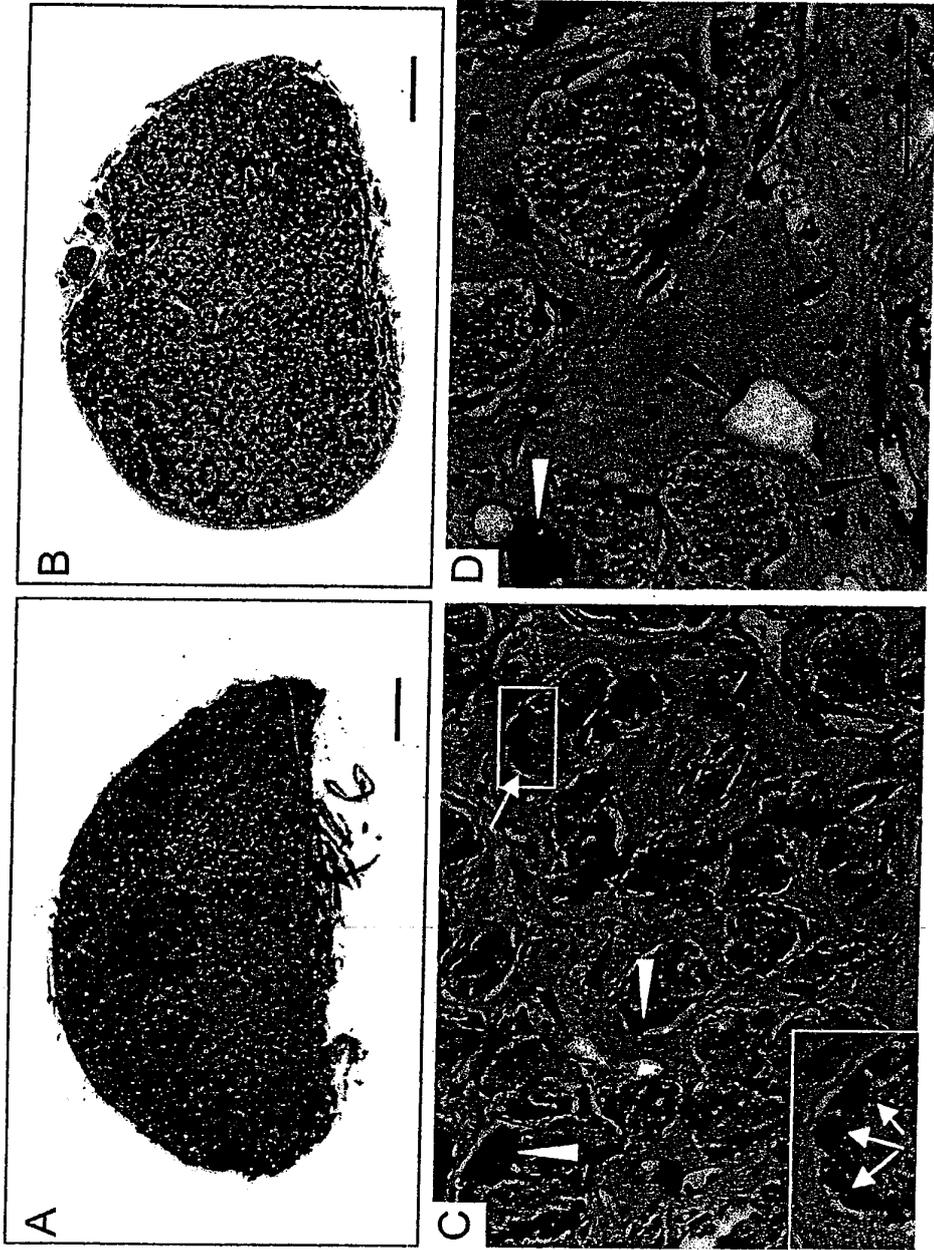


FIGURE 1

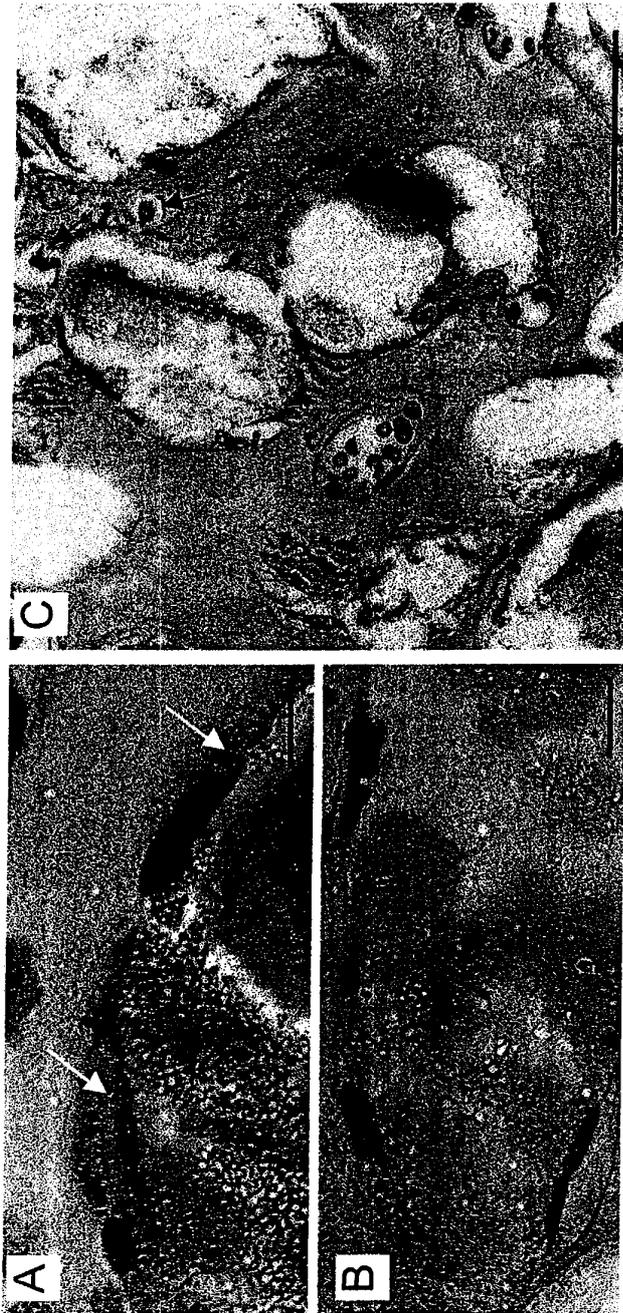


FIGURE 2

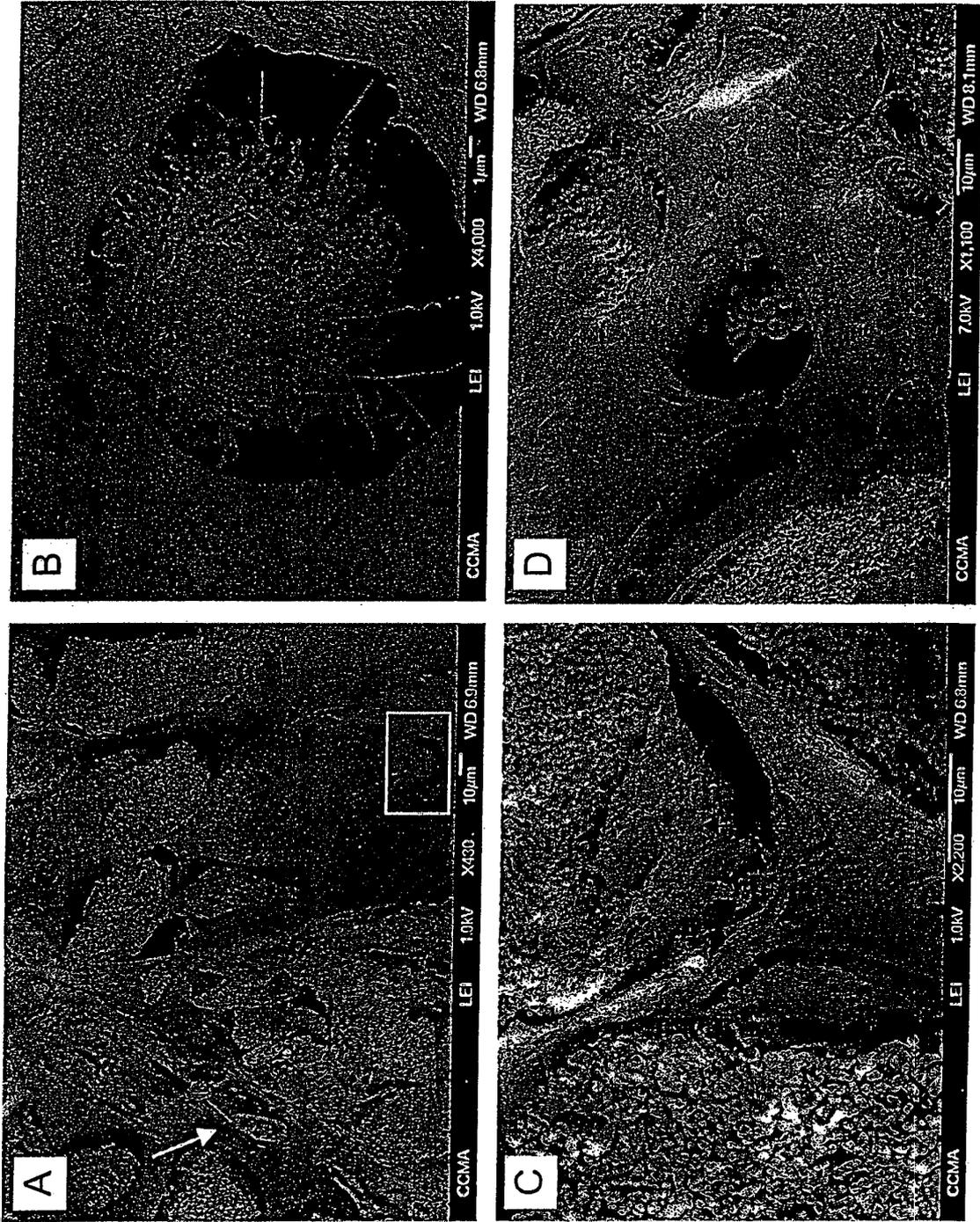


FIGURE 3

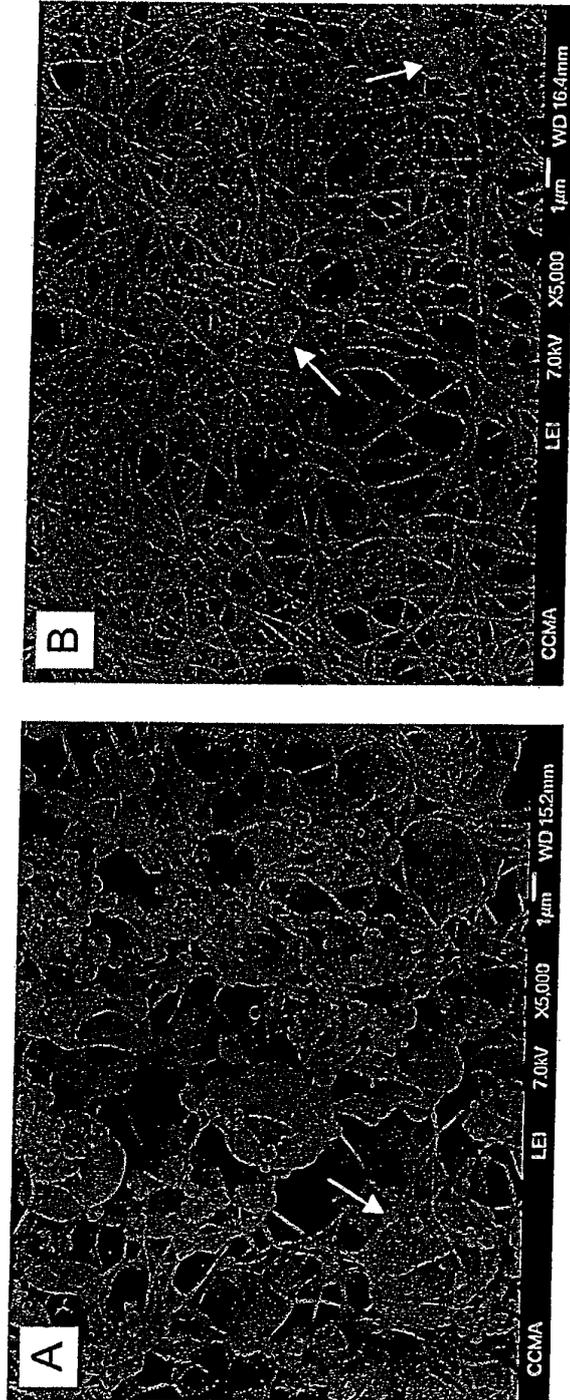


FIGURE 4

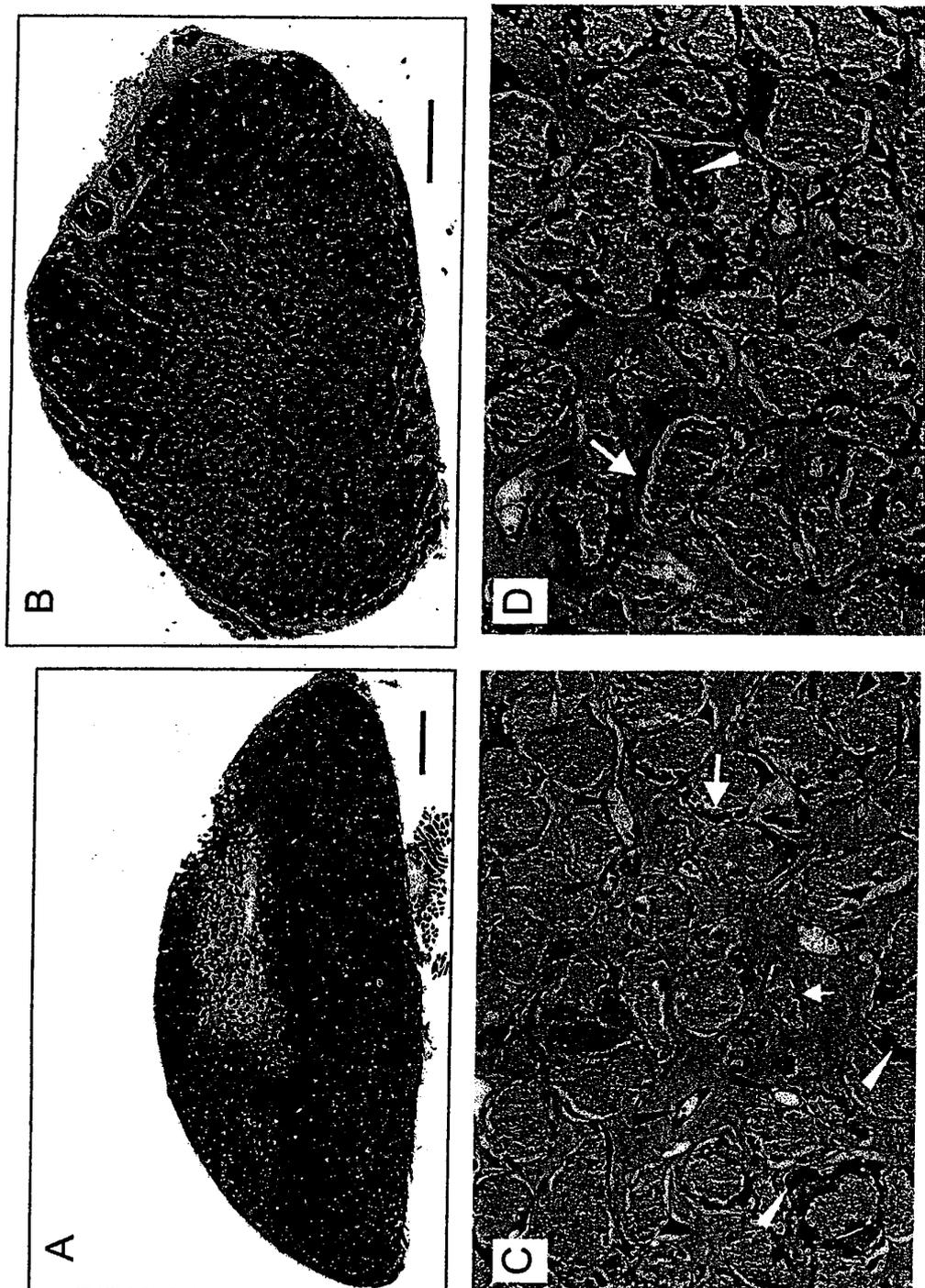


FIGURE 5



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 710262
FR 0803492

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	WO 2006/058153 A (SMITH & NEPHEW INC [US]; FERRANTE JOSEPH M [US]; JANNA SI [US]; MAYR T) 1 juin 2006 (2006-06-01) * alinéas [0003] - [0008] * * alinéas [0037], [0038] * -----	1-22	A61L27/12 A61L27/02 A61L27/58
Y	WO 2006/015275 A (NEW YORK THE TRUSTEES OF COLUM [US] UNIV COLUMBIA [US]) 9 février 2006 (2006-02-09) * page 22, ligne 5-20; revendications 1,3-10 * -----	1-22	
Y	WO 01/81243 A (ECOLE POLYTECH [CH]; LEMAITRE JACQUES [CH]; TERRAZZONI STEPHANE [CH]) 1 novembre 2001 (2001-11-01) * page 1, ligne 17 - page 2 * -----	1-22	
A	HING K A ET AL: "Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes" JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 16, no. 5, 1 mai 2005 (2005-05-01), pages 467-475, XP019212185 ISSN: 1573-4838 * le document en entier * -----	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61L
D,A	WO 02/068010 A (CLEVELAND CLINIC FOUNDATION [US]) 6 septembre 2002 (2002-09-06) * le document en entier * -----	1-22	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 février 2009		Sierra Gonzalez, M	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0803492 FA 710262**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 24-02-2009

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2006058153 A	01-06-2006	AU 2005309599 A1	01-06-2006
		EP 1833452 A1	19-09-2007
		US 2008316855 A1	25-12-2008

WO 2006015275 A	09-02-2006	EP 1781319 A2	09-05-2007

WO 0181243 A	01-11-2001	AT 268309 T	15-06-2004
		AU 4402101 A	07-11-2001
		DE 60103638 D1	08-07-2004
		DE 60103638 T2	10-03-2005
		EP 1280732 A1	05-02-2003
		US 2004029699 A1	12-02-2004

WO 02068010 A	06-09-2002	AU 2002250173 B2	02-02-2006
		BR 0207722 A	30-08-2005
		CA 2439747 A1	06-09-2002
		CN 1503683 A	09-06-2004
		EP 1399199 A1	24-03-2004
		JP 2005506102 T	03-03-2005
		JP 2007050272 A	01-03-2007
		MX PA03007740 A	12-11-2004
		NZ 528218 A	30-11-2006
US 2002161449 A1	31-10-2002		
