

EFFET DE L'ASSOCIATION DU VERRE BIOACTIF AVEC LA BIOMOLECULE DU CHITOSANE SUR LA CONSOLIDATION OSSEUSE CHEZ LA RATTE OSTÉOPOROTIQUE

JEBAHI S^{A,B}, FARHAT L^E, NACER A^D, TRIGUI M^{YD}, BAYA W^D, OUDADESSE H^A, SAHNOUN T^E,
DAOUED J, REBAI T^D, EL FEKI H^C, EL FEKI A^B KESKES H^D

a University of Rennes 1, UMR CNRS 6226, Campus de Beaulieu, 263 av. du Général Leclerc, 35042 Rennes, France.

b Animal Ecophysiology Laboratory, Sfax Faculty of Science, Department of Life Sciences, Sfax, Tunisia.

c Science Materials and Environment laboratory, Sfax Faculty of Science, Sfax, Tunisia.

d Histology, Orthopaedic and Traumatology laboratory Sfax Faculty of Medicine Sfax, Tunisia.

e Service of Medical Oncology, CHU Habib Bourguiba, 3029 Sfax, Tunisia, Sfax, Tunisia.

¥Corresponding author:

dr_moez_trigui@yahoo.fr

Résumé

Dans l'ingénierie tissulaire, certaines molécules bioactives participent activement au métabolisme osseux. Parmi celles-ci on trouve le chitosane. C'est un biopolymère naturel extrait des carapaces de crustacés. Cette étude vise à évaluer l'effet de l'association du chitosane avec le verre bioactif sur la cinétique de la consolidation osseuse chez la ratte ostéoporotique. Des rattes femelles *wistar* ont été divisées en 4 groupes: I, II III et IV utilisées respectivement comme contrôle, ovariectomisées (OVX), implantées avec du verre bioactif VB (VB) et du verre bioactif associé au chitosane (VB-CH). Les analyses par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) et les observations histologiques ont montré l'intégration des biomatériaux avec le tissu osseux hôte. La cinétique de la consolidation osseuse est plus avancée dans le cas de l'association du verre bioactif avec le chitosane. Après 60 jours d'implantation, le calcium (Ca) se stabilise dans le régénérat osseux du VB et du VB-CH à des taux normaux respectivement vers 240 et 238 mg/g. Le taux des phosphores (P) notés dans le régénérat osseux du VB et du VB-CH sont respectivement, de l'ordre de 141 et 138 mg/g. Le rapport Ca/P est égal à 1.7 et 1.72 respectivement, dans le régénérat osseux du VB et du VB-CH. En raison de la biocompatibilité des biomatériaux avec les tissus osseux, les deux biomatériaux VB et du VB-CH devraient constituer une alternative thérapeutique dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

Mots clés : Verre bioactif, chitosane, consolidation osseuse, defect osseux, minéralisation osseuse.

Summary

In tissue engineering, several molecules are widely involved in metabolic bone disease. Among them chitosan possess interesting properties in regenerative medicine. *Wistar* rats were divided into four groups: I, II, III and IV, respectively, used as control, ovariectomised (OVX), implanted with bioactive glass (VB) and implanted with bioactive glass associated with chitosan (VB-CH). Analysis by optical emission spectrometry (ICP-OES) and histological observations have shown the biomaterials integration and a more enhanced increase in the bone mineralization kinetic in the case of VB-CH. After 60 days of implantation, Calcium (Ca) was stabilized at normal levels (240 and 238 mg/g) respectively, in the regenerative bone of VB and VB-CH biomaterials. Phosphorus (P) reached ordinary levels (141 and 138 mg/g) respectively, in the regenerative bone of VB and VB-CH biomaterials. The Ca/P ratio of the regenerative bone of VB and VB-CH represented respectively, 1.7 et 1.72. Due to the biomaterial biocompatibility, the VB and VB-CH biomaterials might be used as an alternative against bone diseases in tissue engineering.

Key words: Bioactive glass, chitosan, bone healing, bone defect, bone mineralization

INTRODUCTION

Le chitosane a montré un fort potentiel pour la médecine régénérative notamment du tissu osseux et du cartilage en raison de leur homologie de structure avec les glycoaminoglycanes de la matrice extracellulaire (MEC) [1,2]. Les biomatériaux à base de chitosane ont également suscité l'intérêt de plusieurs équipes de recherche pour des applications dans le domaine biomédical. Plusieurs architectures composites associant chitosane et hydroxyapatite, utilisées pour la régénération osseuse, améliorent l'adhérence, la prolifération et la différenciation d'ostéoblastes [3]. Par ailleurs, d'autres travaux portant sur la combinaison du chitosane avec des facteurs de croissance ou encore la culture in-vitro de cellules souches mésenchymateuses ont rapporté la capacité à stimuler la formation osseuse [4,5]. Cette molécule a fait l'objet de plusieurs études et a retenu l'attention en tant que candidat pour plusieurs applications médicales parmi les quelles nous citons : membranes de dialyse, fibres de sutures, agent stabilisant de liposomes, antimicrobiennes, antiviral, antitumoral, réducteur de cholestérol au niveau sanguin, agent hémostatique stimulant du système immunitaire et en tant que système de relargage de médicaments [6,7,8,9]. Cependant le manque de données sur les propriétés du verre bioactif associé au chitosane du point de vue biologique nous a conduits à la réalisation de ce travail. Nous cherchons à explorer son activité potentielle dans le domaine biomédical général et dans les cas orthopédiques et thérapeutiques en particulier. Ce travail est concentré sur l'effet de l'association de chitosane au verre bioactif sur la réparation osseuse. La composition chimique du matériau conditionne sa vitesse de dégradation. Celle-ci doit être contrôlée pour obtenir une dégradation directement corrélée dans le temps avec la formation de l'os. Ces biomatériaux associés à des agents thérapeutiques sont de bons candidats pour des applications dans le domaine orthopédique comme matériaux d'implantation favorisant la régénération du tissu osseux. Pour suivre l'implantation de ces deux biomatériaux, une étude chez la ratte *Wistar* durant une période de traitement de 60 jours a été effectuée afin de déterminer la biocompatibilité et la cinétique de la minéralisation osseuse.

MATERIELS ET METHODES

Etude de la cinétique de consolidation osseuse par spectrométrie d'émission optique

La spectrométrie d'émission optique est une méthode physique d'analyse chimique permettant de doser la quasi-totalité des éléments simultanément. C'est une méthode quantitative dont la sensibilité est inférieure à $\mu\text{g/g}$ ou ppm [10]. Les échantillons solides à analyser doivent se présenter sous forme de solution. Les solutions sont nébulisées, puis ionisées par pulvérisation dans un plasma d'argon. Les échantillons ont été mis en solution dans de l'acide nitrique à 2 %. Une fois acidifiées, les solutions ont été envoyées au nébulisateur, grâce à une pompe isostatique, puis pulvérisées en fines gouttelettes (spray) dans la chambre de nébulisation. Le spray a été ensuite transporté vers le plasma grâce à un courant d'argon. Une solution d'acide nitrique à 2 % permet de faire le « zéro ». Pour chaque série d'analyses, six solutions étalons multiélémentaires de concentrations connues ont été préparées de façon à encadrer les valeurs théoriques à analyser.

Etude histologique

Après prélèvement, les pièces osseuses ont été marquées de façon à distinguer la partie distale et la partie proximale. Elles ont infiltrées par l'MMA (méthyle-méthacrylate) par agitation constante à l'aide de rotatif en vitesse lente. La durée des bains était de 1 heure avec un volume de 5 ml environ. Tous les bains ont été réalisés à température ambiante à l'exception du dernier bain d'infiltration qui a été pratiqué à -20°C pendant une nuit. Sur les pièces osseuses incluses, des coupes sériées ont été réalisées à l'aide d'un microtome Polycut S Reichert Jung équipé d'un rasoir au carbure de tungstène. Les coupes ont été récupérées dans l'eau à l'aide d'une bande de papier humide. Des coupes de $7\mu\text{m}$ d'épaisseur ont été réalisées avec la coloration de Goldner.

Protocole opératoire Matériel anesthésique

Les rattes ont été anesthésiées avec un mélange xylozine/kétamine et la patte arrière droite a été rasée. Après l'injection, l'animal a été isolé et placé au calme les yeux fermés. Une anesthésie locale à l'aide de la xylocaïne (unicaine, 2%, UNIMED) a été toujours associée.

Ovariectomie de ratte

Pour éliminer la principale source d'estrogène, les femelles sont ovariectomisées. L'ovariectomie a été pratiquée à l'aide d'ustensiles stériles. Une incision a été réalisée dans la peau et les muscles de l'abdomen sous la dernière cote. Une ligature des oviductes a été pratiquée avant la séparation des ovaires. Un point de suture a été réalisé au niveau des muscles et un second dans la peau.

Déroulement de l'opération

Chaque animal a été installé sur la table chirurgicale en décubitus dorsal, ses quatre membres ont été maintenus en extension à l'aide de lacettes fixées à la table. Pour la ratte un forage a été réalisé au niveau de condyle fémoral. Un préforage a été d'abord réalisé à l'aide d'un foret de taille inférieure (2 mm) à la taille définitive. Puis un forage définitif a été effectué à l'aide d'un foret de taille adaptée aux dimensions du substitut osseux préformé, la vitesse de rotation utilisée est faible pour éviter un écrasement et un échauffement des travées osseuses. Les substituts osseux (VB et VB-CH) ont été insérés dans le trou de forage. La suture cutanée a été réalisée au fil non résorbable. Le pansement postopératoire a été fait avec une compresse stérile passée sur les différentes plaies opératoires après application locale de Bétadine gel. Le pansement a été changé après trois jours de l'opération. Un contrôle quotidien des plaies a permis de vérifier l'état des cicatrices, de nettoyer les plaies.

L'observation clinique

Il s'agit d'un examen de base qui a permis d'évaluer globalement l'état général de l'animal après l'acte opératoire de suivre son comportement envers les aliments et les boissons, d'évaluer leurs réactions envers le manipulateur, d'observer l'animal en mouvement afin d'évaluer sa prise d'appui sur le membre opéré, de déterminer une pesée régulière de chaque animal ainsi qu'un examen attentif des sites opératoires.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les biomatériaux sont couramment utilisés pour remplacer des tissus ou des membres afin de fournir une restauration partielle des fonctions endommagées [11]. Différents domaines de la chirurgie reconstructrice se sont développés et ont

émergé pour améliorer la qualité de vie [12,13]. Dans le domaine d'orthopédie, nous avons cherché à développer de nouvelles structures biomimétiques à base de polymères composites en vue de produire, à plus long terme, des implants biomédicaux attrayants. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de l'association de verre bioactif avec la biomolécule du chitosane sur la consolidation osseuse chez la ratte ostéoporotique. Les concentrations des éléments Ca, P et le rapport phosphocalcique Ca/P ont été déterminées par la méthode ICP-OES. Les échantillons analysés sont ; les os provenant des rattes témoins, des rattes ovariectomisées, implantées par le VB et implantés par le VB-CH (Figures 1et 2). Les concentrations en Ca dans les deux implants VB et du VB-CH ont progressivement augmenté respectivement jusqu'à 240 et 238 mg/g durant 60 jours d'implantation. Le taux des phosphores (P) notés dans le régénérat osseux de VB et du VB-CH sont respectivement, de l'ordre de 141 et 138.5 mg/g à partir du soixantième jour. Le rapport Ca/P est égal à 1.7 et 1.72 respectivement, dans le régénérat osseux de VB et du VB-CH (Figure 3).

L'examen histologique mené sur des pièces osseuses incluses dans du méthyle méthacrylate sans décalcification préalable, coupées et colorées au trichrome de Goldner permet de suivre les différents aspects de tissu osseux après implantation avec le VB et le composite VB-CH (Figure 2 et 3). Les implants ont tous été retenus dans les gaps osseux et sont encore présentes durant la première période. Les lésions de contrôles étaient remplies d'un tissu fibro-cartilagineux tandis que les lésions traitées contenaient des particules de composite VB-CH. Après 4 semaines, les implants ont favorisé un remodelage osseux et une intégration latérale plus complète. Les pertes de substances osseuses traitées avec les implants VB-CH démontrent une guérison plus avancée à 4 semaines que les lésions traitées avec des implants de VB seul. Le composite VB-CH ne paraît pas avoir un effet délétère sur le remodelage osseux dans lequel il a été résident pendant 4 semaines de traitement malgré sa dégradation. En effet, les implants VB-CH ont fait leurs preuves quant à leur capacité de générer du tissu osseux mature, mieux intégré et mieux vascularisé que les VB seuls. Les analyses histologiques n'ont pas montré d'altération structurale au niveau de l'organisation générale des pièces de condyles fémoraux chez les rattes traitées. Le chitosane permet une bonne stabilisation des particules du verre bioactif au site chirurgical et une bonne reconstitution osseuse

avec une intégration accrue du tissu de réparation aux tissus résidents et une vascularisation transitoire accrue de l'os. Cette réparation par le composite VB-CH consiste essentiellement d'apercevoir des trabécules osseuses normales avec un espace trabéculaire bien réduit qui a été caractérisé après ovariectomie par des trabécules osseuses minces avec des grands espaces trabéculaires. Le processus de guérison est très avancé en présence du composite VB-CH. La résorption progressive de VB-CH a été mise en évidence par la fragmentation des particules.

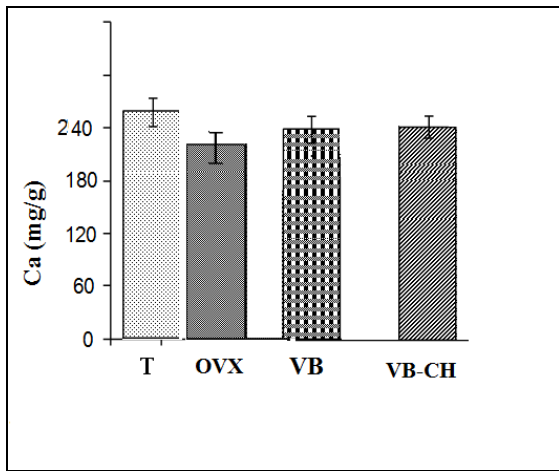


Figure.1. Distribution de Ca chez les ratte implantées avec VB et VB-CH après 60 jours d'implantation.

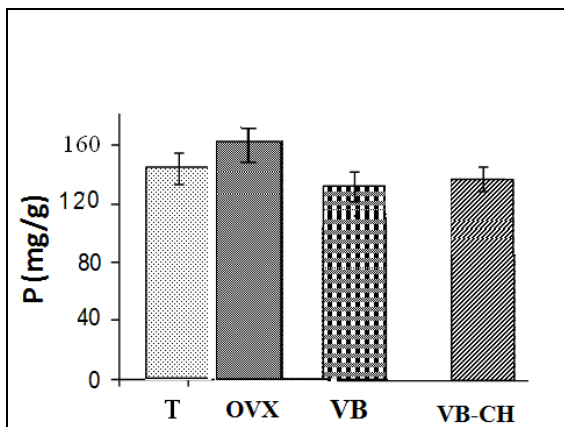


Figure.2. Distribution de P chez les ratte implantés avec VB et VB-CH après 60 jours d'implantation.

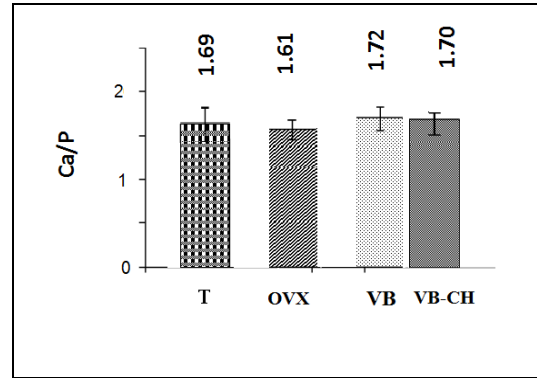


Figure.3. Le rapport Ca/ P chez les ratte implantées avec VB et VB-CH après 60 jours d'implantation.

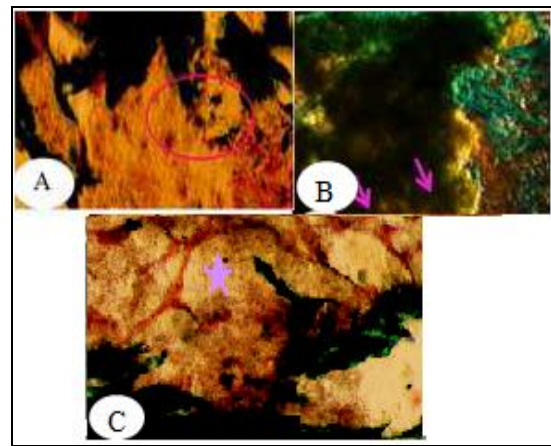


Figure.4. déconnexion trabéculaire pour la ratte ovariectomisée (A) tissu osseux implanté par VB-CH (B) et par VB (C). Coloration Trichrome de Goldner. Cercle déconnexion trabéculaire, →VB-CH, ☆ VB

CONCLUSION

Les résultats *in vivo* chez la rate *Wistar* montrent une bonne biocompatibilité du verre bioactif et du verre bioactif associé au chitosane. La dégradation de deux biomatériaux a été quantifiée par mesure de la concentration en ions phosphate et calcium dans le milieu osseux environnant. Après 60 jours d'implantation, le rapport Ca/P des précipités augmente avec le temps de maturation osseuse. La cinétique de la consolidation osseuse est plus avancée dans le cas de l'association du verre bioactif avec le chitosane. La présence de chitosane dans les matériaux semble être particulièrement importante dans les phénomènes d'initiation de la différenciation ostéoblastique. Les deux implants permettent la stimulation de l'ossification osseuse.

REFERENCES

- [1] Mirahmadi F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Bonakdar S Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013; 33:4786-94.
- [2] Farrugia BL, Whitelock JM, Jung M, McGrath B, O'Grady RL, McCarthy SJ, Lord MS. The localisation of inflammatory cells and expression of associated proteoglycans in response to implanted chitosan. *Biomaterials* 2014;35:1462-77.
- [3] Uskoković V, Desai TA. In Vitro Analysis of Nanoparticulate Hydroxyapatite/Chitosan Composites as Potential Drug Delivery Platforms for the Sustained Release of Antibiotics in the Treatment of Osteomyelitis. *J Pharm Sci* 2013 . doi: 10.1002/jps.23824. [Epub ahead of print]
- [4] Martijn Van Griensven, Camille Thévenin-Lemoine. Stratégies de réparation en orthopédie à l'aide des cellules souches épithéliales et mésenchymateuses Repair strategies in orthopaedics by means of epithelial and mesenchymal stem cells. *Méd Rep Gyn End* 2009 ; 11: 63-70
- [5] Qu ZW, Meng QG, Xiao X, Li BL, Zhang FM. Research of Arginylglycylaspartic to promote osteogenesis of bone marrow mesenchymal cells on chitosan/hydroxyapatite scaffolds. *Biomed Mater Eng.* 2014;24: 683-93.
- [6] Jiang H, Zuo Y, Zou Q, Wang H, Du J, Li Y, Yang X. Biomimetic spiral-cylindrical scaffold based on hybrid chitosan/cellulose/nano-hydroxyapatite membrane for bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013 ; 27:12036-44
- [7] Zhao K, Zhang Y, Zhang X, Li W, Shi C, Guo C, Dai C, Chen Q, Jin Z, Zhao Y, Cui H, Wang Y. Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 389-402
- [8] Kjærup RM, Dalgaard TS, Norup LR, Bergman IM, Sørensen P, Juul-Madsen HR. Adjuvant effects of mannose-binding lectin ligands on the immune response to infectious bronchitis vaccine in chickens with high or low serum mannose-binding lectin concentrations. *Immunobiology* 2013: S0171-2985(13)00196-4.
- [9] Wang M, Yue Y, Dong C, Li X, Xu W, Xiong S. Mucosal immunization with high-mobility group box 1 in chitosan enhances DNA vaccine-induced protection against coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20:1743-51.
- [10] Montaser, D.W. Golightly, eds. Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry VCH Publishers, Inc., New York, 1992.
- [11] Yanovska AA, Stanislavov AS, Sukhodub LB, Kuznetsov VN, Illiashenko VY, Danilchenko SN, Sukhodub LF. Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti-6Al-4V substrates and their characterization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014 ;36:215-20
- [12] Ding H, Zhao CJ, Cui X, Gu YF, Jia WT, Rahaman MN, Wang Y, Huang WH, Zhang CQ A novel injectable borate bioactive glass cement as an antibiotic delivery vehicle for treating osteomyelitis. *PLoS One* 2014 ;9:e85472.
- [13] Jebahi S, Oudadesse H, El Feki H, Rebai T, Keskes H, PascalP, et al. Antioxidative/oxidative effects of strontium-doped bioactive glass as bone graft, in vivo assays in castrated rats. *J Appl Biomed* 2012;10:195—209