

# APPLICATION DU VERRE BIOACTIF POREUX DANS LA BIO-ORTHOPEDIE; ETUDE EXPERIMENTALE CHEZ LA RATTE *WISTAR* OSTÉOPOROTIQUE

SAMIRA JEBABI <sup>A,B</sup>, MOEZ TRIGUI<sup>✉ D</sup>, WALID BAYA<sup>D</sup>, HASSAN OUDADESSE <sup>A</sup>, ABDESSALEM NACER<sup>D</sup>, LEILA FARHAT <sup>E</sup>, JAMEL DAOUED<sup>E</sup>, TAREK REBAI<sup>D</sup>, HAFEDH EL FEKI<sup>C</sup>, ABDEL FATTEH EL FEKI<sup>B</sup> et HASSIB KESKES<sup>D</sup>

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, Tunisie, Sfax, Tunisia.

✉Corresponding author:

dr\_moez\_trigui@yahoo.fr

## Résumé

Les avancées récentes de la biologie permettent d'entrevoir de nouvelles stratégies de comblement osseux, parmi lesquelles les biomatériaux poreux figurent en bonne place. Les verres bioactifs poreux (VBP) ont montré des effets biologiques positifs au niveau de l'ingénierie tissulaire. Cette étude vise à évaluer la tolérance du VBP par le tissu osseux hôte dans le cas d'ostéoporose. Des rattes *Wistar* ont été divisées en cinq groupes: le groupe (I) utilisé comme contrôle négatif (T), après une ovariectomie, les groupes II, III, IV et V respectivement utilisés comme contrôle positif; ovariectomisées (OVX), implantées avec du verre bioactif non poreux VBNP (OVX-VBNP), verre bioactif poreux VBP (OVX-VBP) et présentant des défauts vides (OVX-NI). Les observations histomorphométriques, en microscopie électronique à balayage (MEB) et par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) ont montré l'intégration des matériaux, sans rejet ni infection et un rééquilibrage de la formation du tissu osseux avec une amélioration de l'architecture osseuse. Dans le cas du VBP, les pores favorisent la pénétration du tissu osseux néoformé. Suite à l'implantation de VBP, l'os s'organise en vue de synthétiser la matrice nécessaire au comblement. La pénétration du tissu osseux néoformé dans l'implant confirme le fait que l'architecture poreuse de VBP respecte les critères essentiels de réparation osseuse. Après 60 jours d'implantation, le calcium (Ca) se stabilise à des taux normaux (252 mg/g). Le phosphore (P) retrouve un niveau normal à partir du soixantième jour (145 mg/g). Les apports en Zinc (Zn) au niveau du régénérat osseux induisent une modification majeure du statut en Zn. En effet, une diminution significative du taux de Zn a été notée après 60 jours d'implantation. En raison des propriétés régénératives du tissu osseux, les verres poreux devraient constituer une nouvelle alternative thérapeutique efficace pour les patients affectés par l'ostéoporose.

**Mots clés :** verre bioactif, porosité, ostéoporose, consolidation osseuse, défaut osseux

## Abstract

Recent advances in biology provide new strategies for bone grafting, including porous biomaterials. Porous bioactive glasses (VBP) showed positive biological effects in tissue engineering. [This study is aimed to evaluate](#) the effect of VBP by the host bone in the osteoporosis case. *Wistar* rats were divided into five groups: (I) used as negative control (T), after ovariectomy, groups II, III, IV and V, respectively, used as positive control ovariectomised (OVX), tissue implanted with non porous bioactive glass VBNP (OVX - VBNP), VBP (VBP-OVX) and presented empty defects (OVX - NI). The histomorphometric observations, scanning electron microscopy (SEM) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP- OES) showed integration of the materials, without rejection or infection and a rebalancing of bone formation with an improvement in bone architecture. For VBP, pores favor the penetration of newly formed bone tissue. Following implantation, VBP biomaterial is organized to synthesizing the matrix required for the bone defect filling. The penetration of the newly formed bone in the implant confirmed that the VBP porous architecture enhance bone repair. After 60 days of implantation, calcium (Ca) is stabilized at normal rate (252 mg/g). Phosphorus (P) back to normal value after the sixtieth day (145 mg/g). The element zinc (Zn) presented a major change in the newly bone. Indeed a significant decrease in the Zn concentration was noted after 60 days of VBP implantation. Due to the bone regenerative properties, porous glasses should provide a new effective therapeutic alternative for patients affected by osteoporosis.

**Key words :** bioactive glass, porosity, osteoporosis, bone regeneration, bone defect.

## INTRODUCTION

La bio-orthopédie c'est la discipline où les chercheurs, les médecins et les spécialistes des matériaux visent à reconstruire des tissus squelettiques fonctionnels, dotés de bonnes propriétés biologiques et mécaniques. Ces biomatériaux associés à des agents thérapeutiques sont de bons candidats pour des applications dans le domaine orthopédique comme matériaux d'implants favorisant la régénération du tissu osseux. Parmi ces biomatériaux, on trouve le verre bioactif caractérisé par sa capacité à se lier au tissu osseux quand il est implanté [1]. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et orthopédique, les matériaux poreux sont très attractifs. La porosité peut être considérée comme un paramètre primordial pour un biomatériau. La porosité doit être adaptée à celle de l'os au niveau du site de greffe, qui varie en fonction de la localisation et de la fonction. La taille minimale des pores permettant une ostéoformation au sein du biomatériau est de 100 µm, mais la taille optimale semble être entre 300 et 400µm [2,3]. Dans ce travail nous avons utilisé un verre bioactif poreux dopé en zinc. Le zinc joue un rôle important dans la multiplication cellulaire de l'os ainsi que la fabrication du collagène de la trame osseuse [4]. Le zinc pourrait contribuer également à l'amélioration de la densité minérale des os en cas d'ostéoporose [5]. La porosité permet une bonne invasion tissulaire [6]. Il existe différentes méthodes d'évaluation de la consolidation osseuse, citons comme exemple la méthode radiologique [7]. Le but de cette étude était d'évaluer sur le plan histomorphométrique et physico-chimique l'effet de l'implantation du verre poreux et dopé en Zinc sur le remodelage tissulaire dans un cas d'ostéoporose suite à une ovariectomie (l'ablation bilatérales des ovaires) chez la ratte *wistar*.

## MATERIEL ET METHODES

### Dispositif chirurgical pour l'implantation des biomatériaux

#### 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'instruments 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.

### Matériel chirurgical pour l'opération

Une table de chirurgie, une table pour poser les instruments stériles, une table pour poser le matériel non stérile, une source de lumière chirurgicale (scialytiques), des blouses stériles, des charlottes, des masques, des gants stériles adaptés à la taille du chirurgien, des champs en tissu et en plastique stériles, des compresses stériles, des fils de suture monobrin résorbable de type Monobrin® 3/0 déc. Des instruments chirurgicaux stériles adaptés à l'intervention chirurgicale : des pinces à champs, un manche de scalpel muni d'une lame, une pince à bouts mousses, une pince à dents de souris, une sonde cannelée, des pinces hémostatiques, des ciseaux de Mayo, des ciseaux de Metzenbaum, un porte-aiguille, un bol stérile rempli de solution saline stérile, une seringue de 5 ml stérile un moteur de perceuse (à vitesse rotatoire variable et contrôlé), et un foret adapté de 3 mm de diamètre.

### 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 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**

#### **Etude *in vivo* sur des rattes ovariectomisées : Etude hématologique et de la phosphatase alcaline**

Après 60 jours d'ablation bilatérale des ovaires, une diminution significative ( $p > 0,05$ ) du taux sérique en phosphatase alcaline (PAL) par rapport aux témoins a été signalée. Après 60 jours d'implantation, les différents paramètres hématologiques GB, GR, Hb, Ht, VGM plaquettes n'ont montré aucune différence significative chez les animaux traités (OVX-VBNPS et OVX- VBP) par rapport aux rattes OVX et les contrôles. Après la même période de traitement, aucun changement significatif des Ca, P Si et de Zn au niveau du sérum n'a été observé chez tous les animaux traités par rapport aux témoins (T) (Tableau 1).

#### **Etudes histologique par MEB et histomorphométriques : étude qualitative et quantitative**

Les études histologiques et histomorphométriques nous ont permis de suivre et d'apprécier les changements tissulaires et cellulaires à l'intérieur et à l'extérieur des implants puisque il s'agit d'un matériau poreux (Figure.1.A). *In vivo*, la bioactivité de VBP implique la formation des îlots apatitiques observés dans cette étude dans le pore de ce matériau . Les avantages liés à cette formation de couche apatitique (Figure.1.B) sont nombreux et tous tendent à favoriser un ancrage et une bonne consolidation entre l'os et le VBP. Les pores sont vite envahies par la matière organique. Dans le cas présent des biomatériaux, les pores favorisent la pénétration du tissu osseux néoformé et des cellules spécialisées dans la genèse de l'os (Figure.1.C),

les micropores, quant à eux, demeurent libres parce qu'ils sont trop petits pour être empruntés par les cellules et faciliteraient ainsi la capillarité de fluides et donc la diffusion des nutriments et des métabolites à travers l'implant. L'intégration os-implant est déjà presque parfaite à partir de 60 jours. Suite à l'implantation de VBP l'os, s'organise en vue de synthétiser la matrice nécessaire au comblement de la lacune de résorption d'un très grand nombre d'ostéoblastes. La pénétration du tissu osseux néoformé dans l'implant, confirme le fait que l'architecture poreuse de notre matériau respecte les critères essentielles de réparation osseuse .

Sur le plan histomorphométrique, nous pouvons noter que la quantité d'os à l'intérieur du VBP tel qu'observée à 30 jour est insuffisante. A ce stade il est déjà possible de dire que la durée de l'implantation n'a pas permis au VBP d'améliorer ses qualités osséointégratives. En effet, l'os immature nouvellement synthétisé est encore mal organisé. À 60 jours l'intégration osseuse de VBP s'améliore et la surface du VBP est en contact intime avec le tissu osseux. Les analyses statistiques des résultats ont permis de confirmer cette observation. La performance de VBP semblait être influencée par la biofonctionnalité qui est liée à la structure du verre poreux. La biocompatibilité de deux implants semblait toutefois comparable. En effet, Après 60 jours d'implantations, les analyses quantitatives ont démontré que le paramètres BV/TV était significativement plus élevés dans les groupes de OVX-VBP que celles des rattes traitées avec le VBNP (Figure 2). D'autre part, le paramètre MS / BS est moins important dans les verres VBP comparé à celui des rattes traitées avec VBNP, mais significativement plus élevé par rapport aux contrôles (T). Ces résultats suggèrent fortement que VBP stimule la formation osseuse et augmente le volume d'os trabéculaire sans altérer le profil minéral ou le processus de minéralisation. (Figure 3)

#### **Etude par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) de la cinétique de la bio-consolidation de l'implant VBNP et de l'implant verre bioactif poreux (VBP)**

Après 60 jours d'implantation, l'élément Ca se stabilise à des taux normaux (252 mg/g) (Figure 4). Ceci est plutôt le résultat d'une redistribution du Ca qui est formé suite à la formation de couche apatitique en contact avec les biomatériaux et qui est en équilibre avec le milieu biologique qui

l'entoure. Le P retrouve un niveau normal à partir du soixantième jour (145mg /g) (Figure 5). Les apports en Zn au niveau du régénérat osseux induisent une modification majeure du statut en Zn. En effet des teneurs importantes de l'ordre de 0.28 mg/g ont été mesurées dans l'implant vers le jour 60 postopératoire (Figure 6).

**Tableau.1. Les paramètres hématologiques et les concentrations plasmatiques en Ca, P, Si, Zn et l'activité en phosphatase alcaline chez les groupes contrôles (T), ovariectomisés (OVX), ovariectomisés et implantés avec VBNP (OVX -VBNP), ovariectomisés et implantés avec VBP (OVX -VBP) après la période de 60 jours. \* différence significative comparée avec les rattes témoins.**

	T	OVX	OVX-NI	OVX- VBNP	OVX - VBP
<b>Globules blancs</b> (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	8,11 ± 0,41	7,99 ± 0,79	8,03 ± 0,18	8,31± 0,21	8,30 ± 0,42
<b>Globules rouges</b> (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	7,39 ±0,45	6,99 ±0,75	7,01 ±0,66	8,01 ±0,02	7,51 ±0,53
<b>Hémoglobine</b> (g/dL)	13 ,44 ± 0,56	13,22± 0,44	13,05± 0,22	13 ,29± 0,59	13 ,24 ± 0,56
<b>Hématocrite (%)</b>	44,65 ± 0 ,33	44,05 ± 0 ,73	44,00 ± 0 ,34	45,15 ± 0,10	44,44± 0 ,41
<b>plaquettes</b> (10 <sup>9</sup> /l)	914 ±49	901 ±59	904 ±13	911 ±40	909 ± 27
<b>Volume globulaire moyen (VGM) (fl)</b>	57,70 ± 3,12	54,99 ± 4,05	54,87 ± 3,14	60,00± 1,12	60,70 ± 1,19
<b>Ca (mg/dl)</b>	8,70 ± 0,61	9,01 ± 0,41	9,11 ± 0,21	9,02 ± 0,45	9,3 ± 0,22
<b>Pi (mg/dl)</b>	4,96 ± 0,60	5,04 ± 0,28	5,14 ± 0,20	4,30 ± 0,97	4,21 ± 0,9
<b>Zn (µg/dl)</b>	25,00±0,20	22 ,00±0,10	22,09±0,20	24,00±0,30	27,00±0,30
<b>Si (µg/g )</b>	0,90±0,26	0,87± 0,21	0,86± 0,11	0,85±0,21	0,84±0,21
<b>Phosphatase alcaline (U/l)</b>	38 3,50±28,06	254,90 ± 40,65	254,00 ± 30,00*	250,50 ±44,12*	266,00 ± 37,45*

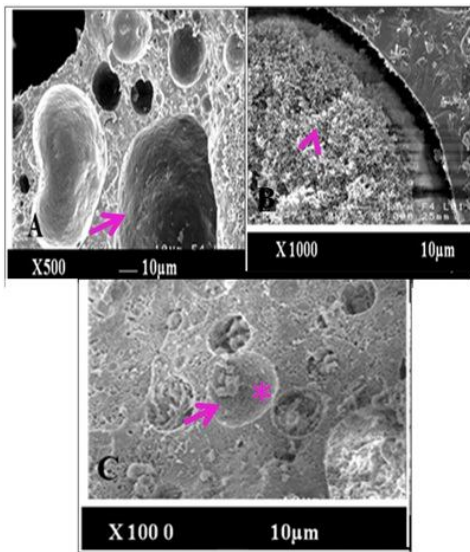


Figure 1: Porosité de l'implant VBP ~ 40µm (A). Dépôt apatitique dans les pores vers le jour 60 post opératoire (B). Invasion cellulaire dans les pores (C). \* cellules, → pores, ▲ apatite.

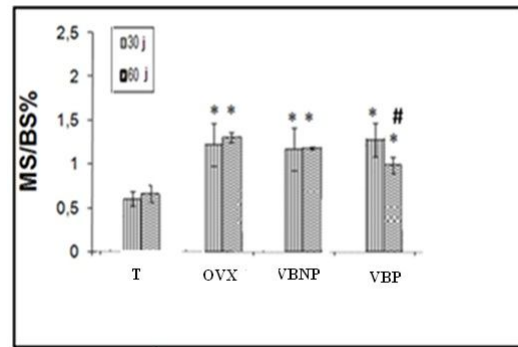


Figure 3 : Paramètre histomorphométrique (MS/BS) mesurés au niveau du fémur spongieuse inclus dans du méthyle méthacrylate sans préalable décalcification. Cette études est menée sur des rattes contrôles, ovariéctomisé, implanté avec VBP et VBNP. \*indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe témoin et ovariectomisé. # indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe de VBNP.

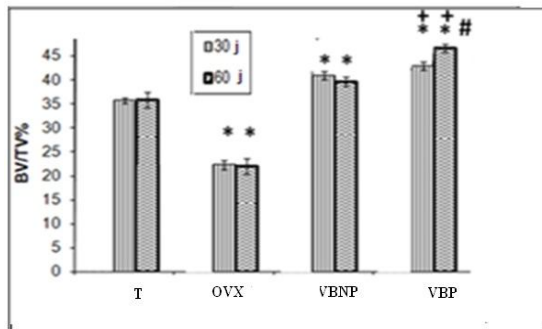


Figure 2 : Paramètre histomorphométrique (BV/TV) mesurés au niveau du fémur spongieuse inclus dans du méthyle méthacrylate sans préalable décalcification. Cette études est menée sur des rattes contrôles, ovariéctomisé, implanté avec VBP et VBNP. \*indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe témoin et ovariectomisé. # indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe de VBNP.

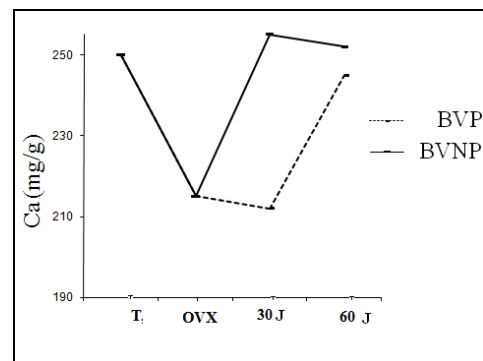
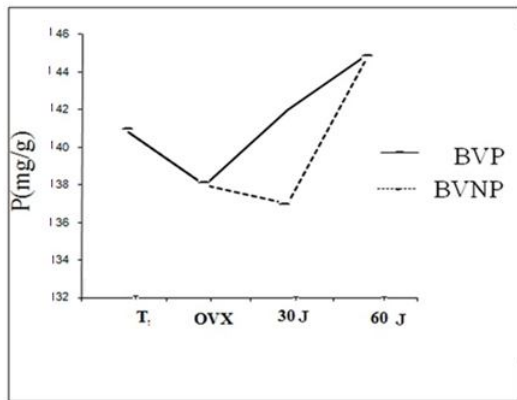
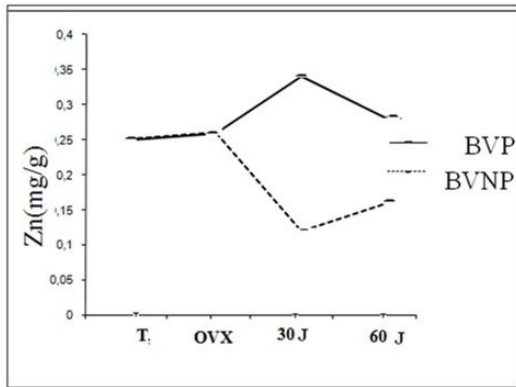


Figure.4. Distribution de Ca chez les rattes implantées avec VBP et BVNP pour 30 et 60 jours.



**Figure.5. Distribution de P chez les rattes implantées avec VBP et VBNP pour 30 et 60 jours.**



**Figure.6. Distribution de Zn chez les rattes implantées avec VBP et VBNP pour 30 et 60 jours.**

## DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si les VBP présentait une biocompatibilité suffisante *in vivo*. Cette évaluation a été réalisée par comparaison des réponses cellulaires obtenues sur les matériaux VBNP. Dans la littérature, la biocompatibilité d'un matériau est souvent évaluée par l'étude de l'adhésion, la prolifération et la morphologie des cellules au contact de l'échantillon. Pour rétablir ses fonctions physiologiques normales, l'os doit réussir à stabiliser l'implant. L'absence des interactions étroites entre les cellules osseuses responsables du remodelage de l'os (ostéoblastes et ostéoclastes) due au traumatisme causé par la présence de l'implant, entraîne la formation d'un os

généralement mal organisé dont la minéralisation pourrait aboutir au cal ou à l'ostéosclérose qui stabilise l'implant [ 8]. La quantité d'os synthétisée à la suite d'une résorption et destinée à combler le fossé laissé par cette résorption est directement proportionnelle au volume du fossé [9 ]. La réaction de défense de l'organisme vis à vis d'un implant artificiel (corps étranger) étant inéluctable, un implant idéal devrait minimiser cette réaction et permettre la croissance des tissus environnants dans les meilleurs délais postopératoires. Dans ce travail, nous avons comme but d'évaluer la qualité de regenerat osseux, en passant par la structure des tissus à l'intérieur et autour des implants. Dans les conditions normales, l'os est engagé dans un processus continu de remodelage pour faire face aux contraintes environnementales auxquelles il est soumis en permanence. Lorsqu'il est traumatisé, l'os guérit ses défauts par remplissage aboutissant au cal [10]. Dans la présente etude, après 60 jours d'implantations , au niveau de surfaces traumatiques autour de VBP il se produit une synthèse de la matrice osseuse destinée à combler la lacune de résorption et l'ampleur dépend du degré de tolérance à l'implant. Cette synthèse de la matrice étant possible puisque notre materiau VBP est considéré comme biocompatible . En effet, le matériau présente une macroporosité et une microporosité. La distribution des pores le long de l'implant, montre l'interconnexion des pores et l'existence d'une microporosité. Dans le cas présent des biomatériaux, si les pores favorisent la pénétration du tissu osseux néoformé et des cellules spécialisées dans la genèse de l'os, les micropores quant à eux demeurent libres parce qu'ils sont trop petits pour être empruntés par les cellules et faciliteraient ainsi la capillarité de fluides et donc la diffusion des nutriments et des métabolites à travers l'implant. La porosité ouverte et interconnectée et l'existence d'une microporosité permet la diffusion à travers l'implant des fluides contenant des nutriments et des métabolites. Ces caractéristiques ont favorisé son intégration et son habitation rapide par du tissu osseux. Les conséquences liées à l'instabilité sont ainsi écartées ce qui devrait procurer de l'espoir au chirurgien orthopédiste dans la lutte contre le rejet de greffe osseuse et l'instabilité des matériaux. Dans cette etude, la présence de l'implant VBP provoque inévitablement un changement dans l'homéostasie osseuse. Le dopage de matériau en Zn influence la vitesse de dégradation.

L'introduction de zinc dans la matrice ralentit légèrement la dissolution de la matrice vitreuse ainsi que la cinétique de formation de la couche d'hydroxyapatite. Dans cette période, l'os s'adhère aux verres bioactifs grâce à la création d'un lien chimique. La surface de VBP sert de support à la repousse osseuse. Après implantation du verre bioactif contenant du Ca et du P les principales réactions ont lieu. C'est la dissolution (décomposition du réseau de silicium) ou lessivage (relargage des éléments constitutifs du matériau).

## CONCLUSION

Après 60 jours d'implantation, les analyses montrent une biocompatibilité de VBP avec le tissu osseux. La porosité et le dopage en Zinc semble avoir été le point culminant de la performance de VBP. Ces caractéristiques ont favorisé son intégration et son habitation rapide par du tissu osseux. Le VBP est stabilisé dans son site d'implantation et sa fusion rapide avec l'os a laissé moins de place à une accumulation des tissus mous.

## REFERENCES

- [1] Jebahi S., Oudadesse H., El Feki H., Rebai T., Keskes H., Pascal P., 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.
- [2] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005; 26: 5474-91
- [3] Liu X, Rahaman MN, Fu Q, Tomsia AP. Porous and strong bioactive glass (13-93) scaffolds prepared by unidirectional freezing of camphene-based suspensions, *Acta Biomater*. 2012 8:415-23.
- [4] Dickey BT, Kehoe S, Boyd D. Novel adaptations to zinc-silicate glass polyalkenoate cements: The unexpected influences of germanium based glasses on handling characteristics and mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2013; 8: 23C:8-21.
- [5] Tokudome Y, Otsuka M Possibility of alveolar bone promoting enhancement by using lipophilic and/or hydrophilic zinc related compounds in zinc-deficient osteoporosis rats. *Biol Pharm Bull*, 2012;35:1496-501
- [6] Diaye M, Degeratu C, Bouler JM, Chappard D. Biomaterial porosity determined by fractal dimensions, succolarity and lacunarity on microcomputed tomographic images. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013;33: 2025-30.
- [7] Ellouze Z., Ben Elhadj Bahri A., Trigui M., Aoui M., Zribi W.1, Elfeki H., Ayadi K., Keskes H. osseux chez le lapin Radiographic evaluation of regenerate mineralization after osseous lengthening in rabbit. *Tunisie Orthopédique* 2010 ; 3: 138 -143
- [8] Manzi G, Romanò D, Moneghini L, Romanò CL. Successful staged hip replacement in septic hip osteoarthritis in osteopetrosis: a case report. *BMC Musculoskelet Disord*, 2012; 2:13: 50.
- [9] Abrahamsson I, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Deposition of nanometer scaled calcium-phosphate crystals to implants with a dual acidetched surface does not improve early tissue integration. *Clin. Oral Implants Res*, 2012, doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02424
- [10] Hinsenkamp M, Collard JF. Bone Morphogenic Protein--mRNA upregulation after exposure to low frequency electric field. *Int Orthop*, 2011; 35:1577-81 2005, 839-848.