

ETUDE COMPARATIVE DE LA CINÉTIQUE DE CONSOLIDATION OSSEUSE ENTRE DEUX CÉRAMIQUES DIFFÉRENTES, HYDROXYAPATITE CARBONATÉE ET VERRE BIOACTIF, CHEZ LE LAPIN BLANC DE RACE NEO-ZÉLANDAISE

SAMIRA JEBABI ^{✧ A,B}, LEILA FARHAT^E, ABDESSALEM NACER^D, MOEZ TRIGUI ^{✧D}, HASSAN OUDADESSE^A, ZOUBIER ELLOUZ^D JAMEL DAOUED^E, WALID BAYA^D, TARAK REBAI^D, HAFEDH EL FEKI ^C, ABDELFAHATTAH EL FEKI^B HASSIB KESKES^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, Tunisie, Sfax, Tunisia.

✧Corresponding author:

dr_moez_trigui@yahoo.fr

Résumé

Prérequis: Les biomatériaux sont des substances d'origine naturelle ou artificielle qui permettent le comblement d'un défaut osseux afin de stimuler la consolidation. **But:** Cette étude vise à évaluer la cinétique de minéralisation et la tolérance de l'hydroxyapatite et du verre bioactif par le tissu osseux hôte. **Méthodes:** Des lapins blancs de race Néo-Zélandaise ont été divisés en 3 groupes: I, II et III, respectivement utilisés comme contrôle, implantés avec du verre bioactif VB (VB) et de l'hydroxyapatite carbonatée (HAPC). **Résultats:** Les analyses par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) ont montré une augmentation de la cinétique de la minéralisation osseuse jusqu'à un rééquilibrage de la formation osseuse. Les deux biomatériaux favorisent l'ostéoconduction du tissu osseux. Après 60 jours d'implantation, le calcium (Ca) se stabilise dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB à des taux normaux respectivement vers 225 et 220 mg/g. Les taux de phosphore (P) notés dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB sont, respectivement, de l'ordre de 125 et 124.5 mg/g à partir du sixième jour. Le rapport Ca/P dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB était respectivement égal à 1.80 et 1.76. **Conclusion:** En raison de la biocompatibilité des biomatériaux avec les tissus osseux, les verres bioactifs et l'hydroxyapatite devraient constituer une alternative thérapeutique dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

Mots clés : verre bioactif, Hydroxyapatite, consolidation osseuse, défaut osseux, minéralisation osseuse .

Summary

Background: The biomaterials are substances of natural or artificial origin that permit the wound bone healing stimulation. **Aim:** This study aims to evaluate the bone mineralization kinetic and the biocompatibility of the hydroxyapatite and bioactive glass. **Methods:** New Zealand white rabbits were divided into three groups: I, II and III, respectively, used as control, implanted with bioactive glass VB (VB) with carbonated hydroxyapatite (HAPC). **Results:** Analysis by optical emission spectrometry (ICP-OES) have shown the integration of the biomaterial with increase in the bone mineralization kinetic. In this study, both of the biomaterials promoted bone tissue osteoconduction. After 60 days of implantation, calcium (Ca) stabilized in the regenerative bone of HAPC and VB respectively, at normal levels (225 and 220 mg/g). Phosphorus (P) stabilized respectively, in the regenerative bone of HAPC and VB at normal levels (125 and 124.5 mg/g). The Ca/P ratio of the regenerative bone of HAPC and VB represented respectively, 1.80 and 1.76. **Conclusion:** Due to the biomaterial biocompatibility, the HAPC and VB might be used as an alternative against bone diseases in tissue engineering.

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

INTRODUCTION

Les biomatériaux utilisés dans le comblement des pertes de substance osseuse suscitent un intérêt croissant de par leur utilisation fréquente en chirurgie réparatrice ou en chirurgie orthopédique. Ils représentent une alternative aux autogreffes (prélèvements de tissu sur le même individu), aux allogreffes (prélèvement de tissu sur un individu de la même espèce vivant ou mort) et aux xéno-greffes (prélèvements de tissu sur une espèce différente) [1]. Dans les pertes de substance osseuse, l'utilisation des matériaux de substitution du tissu osseux est destinée à faciliter la réossification [2]. Les biomatériaux implantés posent le problème de leur devenir dans l'organisme : biotolérance, biofonctionnalité et la biorésorption [3]. Cette dernière propriété est très importante : elle détermine le phénomène par lequel le matériau sera dégradé *in vivo* par des dissolutions spontanées et par l'action des ostéoclastes [4]. Le nouveau tissu osseux régénéré permet de déterminer la cinétique de la consolidation osseuse. La composition chimique du matériau conditionne sa vitesse de dégradation. Celle-ci doit être contrôlée pour obtenir une dégradation corrélée directement dans le temps avec la formation de l'os. Pour mieux contrôler l'intégration et obtenir des biomatériaux de qualité, la complémentarité de la recherche fondamentale et appliquée est indispensable. Parmi ces biomatériaux, on trouve le verre bioactif et l'hydroxyapatite [5, 6]. Ces biomatériaux associés à des agents thérapeutiques trouvent leur intérêt dans le domaine de la chirurgie orthopédique comme stimulateur de la régénération du tissu osseux dans la perte de substance osseuse [7].

Pour suivre l'implantation de ces deux biomatériaux et afin de déterminer la biocompatibilité et la cinétique de la minéralisation osseuse nous avons procédé à une étude chez les lapins mâles blancs de souche NZW durant une période de traitement de 30 et 60 jours.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les animaux

Nous avons utilisé des lapins blancs « Nouvelle Zélande mâles », d'environ 1.09 kg de poids corporel. Ils ont été placés dans une animalerie munie d'un système de ventilation et d'un système réglant les périodes d'obscurité (10 h) et de lumière (14 h), avec une hygrométrie stable,

et dans laquelle la température était réglée à 22°C. Tous les lapins s'acclimatent pendant 1 semaine avant le début de l'expérimentation. La manipulation des animaux a été approuvée par le comité Tunisienne d'éthique et d'utilisation des animaux de laboratoire.

Anesthésie de lapin

Une anesthésie par injection intramusculaire de la kétamine (kétamine 250mg/g PANPHARMA, France) à la dose de 1 ml associé à l'Hypnovel à la dose de 0,1 a été effectuée. Après l'injection, l'animal a été isolé et placé au calme durant 15 à 20 minutes environ, les yeux fermés. Une anesthésie locale à l'aide de la xylocaïne (unicaine, 2%, UNIMED) à la dose de 5 ml a été toujours associée [9]. L'association de l'anesthésie générale et locale a permis d'obtenir un bon endormissement ainsi qu'une bonne analgésie.

La préparation du membre

Le jour de l'intervention, l'animal opéré reçoit une injection pré anesthésique. Cette période, au cours de laquelle l'animal était en respiration spontanée, a été mise à profit pour réaliser la dépilation du membre opéré grâce à la crème dépilatoire. La dépilation a été complète et minutieuse, sur toute la surface du membre (en excluant l'extrémité distale)

Installation, anesthésie locale

Le lapin a été placé sur un champ qui couvre la table opératoire. Un champ stérile fixé à la racine du membre a permis d'isoler le champ opératoire du reste du corps de l'animal permettant de réaliser la manipulation dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

L'acte chirurgical

Mise en place de l'implant : On réalise une incision cutanée et sous cutanée sur la face interne du tibia puis une ouverture de l'aponévrose musculaire, on passe sous le corps musculaire du tibia pour tomber directement sur la face craniomédiale du tibia. C'est par des ciseaux à disséquer et une rugine fine que les corps musculaire sont décollés de toute la circonférence du tibia. Avec une scie oscillante, un trou de 0.5 cm de la partie médio diaphysaire du tibia a été enlevé. Les deux biomatériaux ; hydroxyapatite et verre bioactif ont comblé la perte de substance osseuse. La fermeture des plans profonds s'est faite par du fil résorbable après un lavage abondant au sérum physiologique. La suture cutanée a été réalisée au

fil non résorbable. Nous avons appliqué, avant le pansement, de la Bétadine gel sur les différentes plaies opératoires afin de les désinfecter

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 de 0.1 ppb-20 ppb [8]. Les échantillons solides 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.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les concentrations des éléments Ca, P et le rapport phosphocalcique Ca/P ont été déterminées par la méthode ICP-OES durant la période des 20, 30, 45 et 60 jours. Les échantillons analysés sont ; les os provenant des lapins témoins et des lapins traités (Figures 1 et 2). Les concentrations en Ca dans les deux implants HAPC et du VB présentés dans l'os nouvellement formé ont été respectivement de l'ordre de 129 et 128.5 mg/g après 20 jours d'implantation. Le taux des phosphores (P) notés dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB a été respectivement, de l'ordre de 125 et 124.5 mg/g durant la même période d'implantation. Le rapport Ca/P a été respectivement de 1.80 et 1.76, dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB (Figure 3). A ce stade nous pouvons déjà conclure que la durée de l'implantation n'a pas permis d'améliorer la qualité osseointégrative de deux biomatériaux VB et l'HAPC. En effet, l'os immature nouvellement synthétisé est encore mal organisé. A cette phase, le rapport phosphocalcique de l'HAPC a été significativement plus important que celui de VB. Après implantation, nous avons noté la présence d'une grande quantité d'os mal organisé, preuve

d'une calcification récente de la matrice osseuse qui a donné du cal osseux. Le comblement par un nouveau tissu (fibrocartilagineux) de l'espace laisse entrevoir un agrandissement de la taille du tissu mou autour des BV. Vers le 30^{ém} jour, l'intégration osseuse de VB s'est améliorée et le rapport phosphocalcique de BV a été augmenté sans différence significative par rapport au HAC. Nous pouvons alors confirmer que la durée de l'implantation a une influence positive sur l'intégration osseuse de VB. Il paraît évident que le VB, à cette période, commence à être intégré par le tissu osseux en provenance de l'os adjacent et que la greffe se trouve maintenant renforcée physiologiquement. Nous pouvons conclure que l'intégration osseuse du BV a commencé tard par rapport au l'HAPC mais dans le délai physiologique de la guérison osseuse (Stübinger et al., 2010). Après la période de 60 jours, les concentrations en Ca dans les deux implants l'HAPC et du VB ont progressivement augmenté respectivement jusqu'à 225 et 220 mg/g durant 60 jours d'implantation. Le taux des phosphores (P) noté dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB a été respectivement, de l'ordre de 125 et 124.5 mg/g à partir du soixantième jour. Le rapport Ca/P a été respectivement de 180 et 176, dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB (Figure 3). Nous pouvons confirmer aussi que la formation osseuse en présence de VB est bien effective après 60 jours d'implantation et se caractérise par une forte activité ostéoblastique aboutissant à la synthèse de l'ostéoïde puis le tissu minérale. Dans ce travail, nous avons comparé les effets de la régénération osseuse du point de vue minéralisation osseuse suite à la détermination des éléments majeurs présent dans l'os (Ca et P) et le rapport phosphocalcique. 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 (Hinsenkamp *et al.*, 2011). En présence du BV et du l'HAP qui sont considéré comme corps étranger, des mécanismes de défense aboutissant souvent à un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse. L'implant mal toléré est naturellement soumis à une attaque du système immunitaire. Ce qui peut conduire à long terme à son rejet de l'implant (Waldron-Lynch *et al.*, 2012). Or, dans notre cas, la calcification aboutit à la formation d'un os bien organisé. Après 60 jours d'implantation, on suppose qu'au niveau de surfaces traumatiques autour du VB il se produit une synthèse d'une matrice osseuse

destinée à combler la lacune de résorption et que l'ampleur de cette synthèse dépend du degré de tolérance de l'implant. Cette synthèse de la matrice étant possible puisque notre matériau VB est considéré comme biocompatible. Dans notre étude, nous avons remarqué qu'à 60 jours, la situation s'est améliorée par rapport au 30^{ème} jour ce qui témoigne le retour au bon fonctionnement des mécanismes réparateurs de l'os confirmant ainsi notre hypothèse que la biocompatibilité n'est pas à l'origine de ce retard de consolidation. La calcification de cette matrice aboutit au cal qui stabilise l'implant. Une coloration au Trichrome de Goldner modifié, a été réalisée pour l'acquisition de données concernant l'effet des biomatériaux *in vivo*. Cette étude permet de montrer les différents comportements des matériaux. Ces deux biomatériaux combleront l'intégralité de la lacune. Après 30 jours d'implantation, peu de néoformation osseuse a été observée au niveau des coupes histologiques. Cette coupe permet de mettre en évidence de tissu ostéoïde, témoin de la néosynthèse osseuse. Cependant, l'un des solvants utilisés dans cette coloration dénature le matériau ce qui laisse apparaître des plages jaunâtres au sein de la matrice osseuse à la place du matériau. Egalement, des plages fibrinoïdes ont pu être mises en évidence au centre de certaines zones de comblement de biomatériaux. A ce délai, le matériau ne remplit pas l'intégralité de la lacune et différentes zones de repousse osseuse ont pu être détectées. A partir de 60^{ème} jour, l'étude qualitative a montré une importante capacité de cicatrisation des lésions. Pour autant, la perte osseuse n'apparaît pas encore totalement comblée. L'ossification s'est mise en place de proche en proche de façon centripète de la périphérie vers le centre. L'étude histologique a montré aussi que les limites de contact entre le tissu et le biomatériau de substitution sont dépourvues de réactions inflammatoires à corps étranger. En générale, les deux matériaux semblent être bien acceptés par les tissus osseux environnants. A partir du 60^{ème} jours, une importante dissémination des biomatériaux au sein des espaces osseux s'est produite. Dans notre cas les deux biomatériaux de substitution osseuse, sont étroitement liés à la néo vascularisation de l'implant. En effet, une des difficultés majeures en ingénierie tissulaire osseuse est que les implants doivent être vascularisés rapidement pour assurer en particulier la survie des cellules susceptibles de reconstruire le tissu (apport de nutriments, d'oxygène...) [10,11].

Or notre hydroxyapatite carbonatée a permis une colonisation de l'implant par les cellules osseuses du receveur. Il est indispensable aussi que le verre bioactif soit en contact intime avec des cellules osseuses, ce contact favorise la biointégration ainsi que la biocompatibilité [12]. La dissolution permet la précipitation de cristaux apatitiques [13,14]. L'ostéoconduction progressive est assurée ensuite par la pénétration cellulaire et la micro vascularisation osseuse. A moyen terme, il existe une résorption du matériau avec ostéoformation qui aboutit à un équilibre résorption-apposition [15]. Ainsi, le réhabilitation est centripète et progressive. L'ostéoconduction débute par une phase de résorption entraînant un relargage des ions contenus dans le substitut.

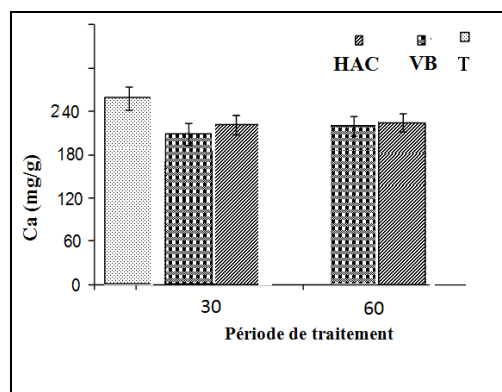


Figure.1. Distribution de Ca chez les lapins implantés avec HAPC et VB pour 30 et 60 jours.

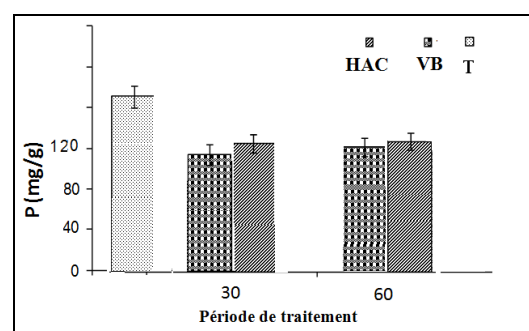


Figure.2. Distribution de P chez les lapins implantés avec HAPC et VB pour 30 et 60 jours.

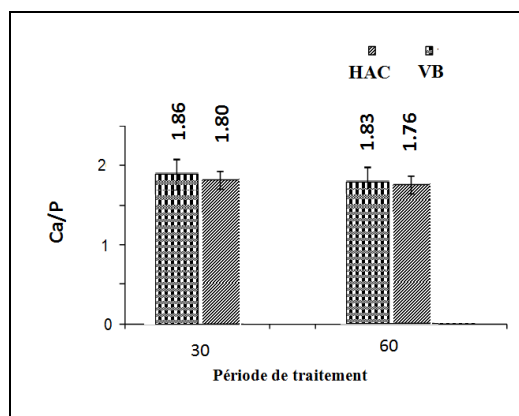


Figure.3. Le rapport Ca/ P chez les lapins implantés avec HAPC et VB pour 30 et 60 jours.

CONCLUSION

Les résultats *in vivo* chez le lapin (NZW) montrent que 20 jours postopératoire, le rapport Ca/P exhibe une maturation osseuse limitée pour les deux biomatériaux mais très signalé au niveau du BV. Après 60 jours d'implantation, le rapport Ca/P de deux régénérats osseux regagne le taux normaux sans variation significative entre les deux implants. Les deux implants facilitent la mise en place de phase organique pour stimuler l'ossification osseuse. En effet, une bonne biocompatibilité et une bonne ostéointégration de BV et de l'HAPC a été signalé.

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] Jebahi S, Oudadesse H, Abdessalem N, Leila Farhat, Moez Trigui, Jamel Daoued, Rebai T, El Feki H, El Feki A, Hassib keskes. Application of porous bioactive glass in bio-orthopedics; Experimental study in osteoporotic Wistar rat. *Tunisie Orthopédique. In press.*
- [3] Konofaos P, Kashyap A, Ver Halen J. Biomedical approaches to improve bone healing in distraction osteogenesis: a current update and review. *Biomed Tech (Berl)*. 2014.8:1-7. doi: 10.1515/bmt-2013-0096. [Epub ahead of print]
- [4] Leventis MD, Fairbairn P, Dontas I, Faratzis G, Valavanis KD, Khaldi L, Kostakis G, Eleftheriadis E. Biological Response to β -Tricalcium Phosphate/Calcium Sulfate Synthetic Graft Material: An Experimental Study. *Implant Dent*. 2013. [Epub ahead of print]
- [5] S. Jebahi, M. Saoudi, R. Badraoui, H. Oudadesse, Z. Ellouz, H. Keskes, A. El Feki, H. El Feki, "Biologic Response to Carbonated Hydroxyapatite Associated with Orthopedic Device: Experimental Study in a Rabbit Model," *Kor J Path*, 2012; 4 6, 48-54.
- [6] Plewinski M, Schickle K, Lindner M, Kirsten A, Weber M, Fischer H. The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation. *Dent Mater*. 2013;29:1256-64
- [7] Koudehi MF, Fooladi AA, Mansoori K, Jamalpoor Z, Amiri A, Nourani MR Preparation and evaluation of novel nano-bioglass/gelatin conduit for peripheral nerve regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 [Epub ahead of print]
- [8] Montaser, D.W. Golightly, eds. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry* VCH Publishers, Inc., New York, 1992.
- [9] 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
- [10] Cavalcanti S.C.S.X.B., D.D.S., Pereira C.L., Mazzone R.; " Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria" *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2008;36, 354e359
- [11] Mellibovsky L., Marinõso M.L., Cervantes b F., "Relationship among densitometry, bone histomorphometry, and histologic stage in idiopathic myelofibrosis " *Bone* 2004; 34 330– 335
- [12] Landi E., Celotti G., Logroscino G. & Tampieri A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute; *Journal of the European Ceramic Society*; 2003; 23 2931–2937
- [13] Frayssinet P., Trouillet J., Rouquet N., Azimus E. & Autfage A.; "Osteointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition"; *Biomaterials*; 1993; 14, 6, 423-429.
- [14] Landia E., Celottia G., Logroscinob G. & Tampieria A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute *Institute of Science and Technology for Ceramics* 2003; 2931–2937
- [15] Pamela H., Uwe G., Charles J., Doillon, David C. & Clemens A.; van Blitterswijkb, Jake E, Barralet, Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants *Biomaterials* 2008: 29 944–953.