

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

En Cotutelle Internationale avec
THÈSE / UNIVERSITÉ DE SFAX

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

ET DE L'UNIVERSITÉ DE SFAX

Mention: Sciences des Matériaux

Ecole Doctorale Sciences De La Matière et Sciences du Vivant

présentée par

Siwar Mosbahi

préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6226
UFR Sciences et Propriété de la Matière (SPM) et
Faculté des Science de Sfax

**Etude biologique et
physico-chimique de
verre bioactif/
bisphosphonates et de
vitrocéramique pour le
comblement des pertes
osseuses chez les
petits animaux**

**Thèse soutenue à Sfax
le 30 Mai 2016**

devant le jury composé de :

M. Jean Christophe Fricain

Professeur, Université de Bordeaux 2 / *rapporteur*

M. Slim Tounsi

Professeur, Centre de biotechnologie de Sfax / *rapporteur*

Mme. Dominique Chauvel- Lebret

Maitre de conférence (HDR), Université de Rennes 1 /
examinatrice

M. Abdelfattah Elfeki

Professeur, Université de Sfax / *examinateur*

M. Hafed Elfeki

Professeur, Université de Sfax / *co-directeur de thèse*

M. Hassane Oudadesse

Professeur, Université de Rennes / *directeur de thèse*

Introduction générale et problématique	15
Rappel bibliographique	19
I-Tissu osseux	20
I-1- Généralités sur le tissu osseux.....	20
I-2- Différents types d'os	20
I-3-Composition de l'os	22
I-3-1- Matrice extracellulaire.....	22
I-3-2-Matrice cellulaire.....	26
I-4- Remodelage osseux	29
I-5- Troubles osseux.....	31
I-5-1- Notion d'ostéoporose	31
I-5-2- Types d'ostéoporose.....	32
I-5-3- Causes d'ostéoporose	33
I-5-4- Traitement de l'ostéoporose	40
II-Biomatériaux	42
II-1- Définition	42
II-2- Classification des matériaux	43
II- 2- 1- Biomatériaux d'origine naturelle.....	43
II-2-2- Les biomatériaux métalliques.....	44
II-2-4-Les biomatériaux céramiques : Biocéramiques.....	45
II-3- Caractéristiques des matériaux	48
II-3-1- Caractéristiques physico-chimiques des matériaux	48
II-3-2- Caractéristiques biologiques des matériaux.....	50s
Méthodologies	58
I-Synthèse des verres bioactifs.....	59
I-1-Synthèse par fusion du verre bioactif 46S6.....	59
I-2- Synthèse d'une vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane	59
I-3- Synthèse d'un matériau hybride: Verre associé au risédronate.....	61
II- expérimentation in vitro en l'absence des cellules (immersion dans le SBF (simulated body fluids)	63
III-Expérimentations « <i>in vivo</i> »	63
III-1- Etude <i>in vivo</i> chez un modèle animal ostéoporotique (rattes irradiées aux rayons gamma).....	64
III-1- 1- Irradiation des rattes.....	64
III-1-2- Implantation	64
III-2- Etude <i>in vivo</i> chez un modèle animal à perte osseuse (lapins à pertes osseuses induites).....	66

IV- Principe des techniques d'analyse biologique et physicochimique.....	70
IV-1- Analyses physico-chimiques	70
IV-1- 1-Spectroscopie d'absorption Infrarouge (FT-IR).....	70
IV-1- 2- Diffraction des rayons X (DRX)	72
IV-1-3- Microscopie électronique à balayage (MEB).....	72
IV-1-4- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	74
IV-1-5- Spectrométrie par diffusion Raman (RMAN)	75
IV-1-6- Ultraviolet- visible (UV-VIS)	77
IV-1-7- Spectrométrie d'émission optique : ICP-OES.....	77
IV-2-Analyses biologiques.....	78
IV-2-1- Etude hématologique et biochimique dans le sérum sanguin	78
IV-2-1-1- Détermination des paramètres hématologiques	78
IV-2-1-2- Evaluation des paramètres biochimiques.....	79
IV-2-2- Exploration du stress oxydant et mesure des enzymes impliquées dans le stress oxydant.....	82
IV-2-3- Etude histologique.....	90
IV-2-4- Imagerie médicale (Radiographie, scanner et micro scanner).....	91
V-Présentation des résultats et analyse statistique.....	93
Résultats et discussions	94
Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-chimique des verres bioactifs associés au risédronate (46S6-xRIS)	95
I-Introduction	96
II-Résultats.....	96
II-1-Caractérisation structurale par diffraction des rayons X des composés 46S6-xRIS	96
II-2-Analyse par spectrométrie infrarouge (FTIR) des composites 46S6-xRIS.....	98
II-3-Investigation morphologique par MEB des composites 46S6-xRIS	102
II-4- Etude par MAS-RMN ³¹ P et ²⁹ Si	104
II-5- Spectrométrie par diffusion Raman	110
II-6-Cinétique de libération du silicium dans le KCl après incubation des compositions 46S6-xRIS	112
II-7 –Etude de la cinétique d'échange du risédronate avec le KCl lors d'incubation des composites 46S6-xRIS	113
III-Discussion.....	114
IV-Conclusion.....	117
Partie 2: Test in vitro sans cellules (Immersion dans le SBF) des biomatériaux synthétisés	119
I-Introduction	120

II- Résultats	120
II-1-Exploration physico-chimique des composites 46S6-xRIS après expérimentation <i>in vitro</i> sans cellules	120
II-1-1-Etude de structure par diffraction des rayons X (DRX)	120
II-1-2-Analyse par spectrométrie infrarouge (FTIR) des composés 46S6-xRIS après immersion dans le SBF	123
II-1-3- Composition ionique du SBF après immersion des composés 46S6-xRIS après différents délais	129
II-1-4- Analyse morphologique par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée avec la microanalyse – spectrométrie en énergie (EDS).....	133
II-1-5-Spectrométrie par diffusion Raman	138
III-Discussion.....	141
IV-Conclusion.....	142
Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma.	144
I-Introduction	145
II-Résultats	146
II-1- Etude biologique	146
II-1-1- Exploration hématologique et biochimique	146
II-1-2- Etude de la balance oxydative.....	148
II-1-3- Investigation histologique	152
II-2-Etudes physicochimiques	155
II-2-1-Spectroscopie d'absorption infrarouge	155
II-2-2-Diffraction des rayons X	158
II-2-3- Spectrométrie d'émission optique (ICP-EOS).....	161
II-2-4- Etude morphologique par la microscopie électronique à balayage.....	166
II-2-5- Etude du bioimplant-tissu osseux par microanalyse- spectrométrie en énergie (EDS)	173
II-2-6- Exploration par résonance magnétique nucléaire du solide (MAS-RMN) de l'interface bioimplants-os	175
III-Discussion.....	184
IV-Conclusion.....	187
Partie4:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)	189
I-Introduction	190
II-Résultats	190

II-1- Etude biologique	190
II-1-1- Suivi clinique	190
II-1-2- Evaluation macroscopique	191
II-1-3 Suivi radiologique	192
II-1-4- Etude histologique	197
II-2- Exploration physicochimique	202
II-2-1- Etude morphologique par la microscopie électronique à balayage (MEB) ..	202
II-2-2- Analyse quantitative par EDS	203
II-2-3- Analyse structurale par la diffraction des rayons X (DRX).....	205
II-2-4- Evaluation par spectrométrie d'infrarouge (FT-IR).....	207
II-2-5- Analyse par résonance magnétique nucléaire de ^{29}Si et de ^{31}P	208
III-Discussion.....	212
IV-Conclusion.....	217
Discussion générale	219
Conclusions générales	222
Perspectives	226
Annexes	243
Résumé	250

Liste des Figures

Rappel bibliographique

Figure 1: Répartition de l'os compact et spongieux dans un os long.....	21
Figure 2: Aspect structural de l'os compact et de l'os spongieux [Toppets et al ,2004].....	22
Figure 3: Structure d'une fibre de collagène de type I.....	23
Figure 4: Projection de la structure de HA sur le plan de base (001).	25
Figure 5: Facteur agissant sur la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes [Fleisch et al, 1998].....	27
Figure 6: Processus de formation des ostéoclastes	29
Figure 7: Les différentes phases de remodelage osseux	31
Figure 8: Os trabéculaire normal et os trabéculaire ostéoporotique : Présence de pores dans les trabécules ostéoporotiques (b) [Martini, 2004].....	32
Figure 9: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.....	36
Figure 10: Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. (LOO•) : radical peroxyde lipidique, (LOOH) : hydroxyle lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé,	39
Figure 11: Physiopathogénie de la cytotoxicité des radiations ionisantes, [Little et al, 2002]	40
Figure 12: Classification des biomatériaux.....	43
Figure 13: Formule chimique des pyrophosphates et des bisphosphanates	54
Figure 14: Formules de quelques BPS utilisées comme médicaments.	55

Méthodologie

Figure 1. Stérilisation du bioimplant avec les rayons Gamma 60CO (Equinox, Royaume-Uni)	62
Figure 2. Protocole expérimentale de l'implantation des rattes irradiées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.....	66
Figure 3. Position du mini-fixateur externe (A), groupe sans (B) et avec 46S6-10Zn-2Ti (C).	69
Figure 4. Principe de la spectrométrie FT-IR.....	71
Figure 5. La fréquence d'absorption est égale à $\nu = k \cdot H_0$	75
Figure 6. Principe et Exemple de spectre Raman.....	76

Résultats et Discussions

Partie 1

Figure 1A: Diffractogramme DRX du 46S6 et de risédronate (RIS).....	97
Figure 1B : Diffractogramme DRX de la composite 46S6 -xRIS (après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80).	98
Figure 2A: Spectre infrarouge du composite 46S6-8RIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80 min).	100
Figure 2B: Spectre infrarouge du composite 46S6-12RIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80 min).	101
Figure 2C: Spectre infrarouge du composite 46S6-20RIS après différents délais d'incubations dans le KCl (20, 40, 60 et 80 min).	102
Figure 3 : Clichés MEB du risédronate et des composites 46S6-xRIS (x=8, 12 et 20 %)....	104
Figure 4A : Spectres MAS-RMN 29Si du 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.	107
Figure 4B : Spectres MAS-RMN 31P du 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.	109
Figure 5: Spectre RAMAN des composites 46S6-xRIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80).	111
Figure 6 : Cinétique du relargage de silicium des composites 46S6-xRIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80).	112
Figure 7: Spectre UV-Visible du risédronate monosodique 0,2 mM dans un milieu KCl 1mM à pH =7,4 et à 25°C.	113
Figure 8: Spectre UV-Visible de la cinétique du relargage du risédronate et des composites 46S6-xRIS (X=8, 12 et 20 %) avec le milieu d'incubation (KCl) après différents délais d'incubation (20, 40,60 et 80 min).	114

Partie 2

Figure 1 : Diffractogramme des rayons X (DRX) de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (X= 8, 12 et 20) après 1 jour d'immersion dans le SBF.	121
--	-----

Figure 2 : Diffractogramme (DRX) de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (X= 8, 12 et 20) après 15 jours d’immersion dans le SBF.....	122
Figure 3 : Diffractogramme (DRX) de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20) après 30 jours d’immersion dans le SBF.....	123
Figure 4 : Spectre IR de la surface 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20) après 1 jour d’immersion dans Le SBF.	124
Figure 5 : Spectre IR de la surface de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20) après 15 jours d’immersion dans Le SBF.	126
Figure 6 : Spectre IR de la surface 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20) après 30 jours d’immersion dans Le SBF.....	128
Figure 7 : Concentration de silicium (Si) dans le SBF en fonction du temps d’immersion de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20).....	131
Figure 8 : Concentration de calcium (Ca) dans le SBF en fonction du temps d’immersion de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20).....	132
Figure 9 : Concentration de phosphore (P) dans le SBF en fonction du temps d’immersion de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20).....	133
Figure 10 : Etudes morphologique des composites (46S6-0RIS, 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et du 46S6-20RIS) après 1 jour d’immersion dans Le SBF.....	135
Figure 11 : Etudes morphologiques des composites (46S6, 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et du 46S6-20RIS) après 30 jours d’immersion dans Le SBF.	138
Figure 12 : Etudes par microanalyse – spectrométrie en énergie (EDS) des composites (46S6-8RIS, 46S6-12RIS et du 46S6-20RIS) après 30 jours d’immersion dans Le SBF.	138
Figure 13 : Spectres RAMAN du composite 46S6-8RIS avant et après 1 et 30 jours d’immersion dans le SBF.....	139
Figure 14 : Spectres RAMAN du composite 46S6-20RIS avant et après 1et 30 jours d’immersion dans le SBF.....	140

Partie 3

Figure 1 : Variation des taux sériques de la phosphatase alcaline ($\mu\text{Kat/l}$) chez les rattes témoins et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.....	148
Figure 2 : Taux des MDA dans l’os (nmol/mg des protéines) chez des rattes témoins et des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.....	149

Figure 3 : Activité des CAT dans l'os (μ moles de H_2O_2 /min/mg de protéines) chez des rattes témoins et des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.....	150
Figure 4 : Activité des GPx dans l'os (nmol GSH/min/mg de protéines) chez des rattes témoins et des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.....	151
Figure 5 : Activité des SOD dans l'os (unité SOD/mg de protéines) chez des rattes témoins et des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.	152
Figure 6 : Coupe histologique des rattes irradiées à 2Gy (A) et rattes irradiées à 15Gy (B).153	
Figure 7 : Coupe histologique des rattes irradiées à 15Gy et implantées avec le 46S6-10Zn-2Ti après 30 jours.....	154
Figure 8 : Coupe histologique des rattes irradiées à 2Gy et implantées avec le 46S6-10Zn-2Ti après 30 jours	155
Figure 9 : Spectres IR du 46S6 après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à différentes doses des rayons γ	157
Figure 10 : Spectres IR du 46S6-10Zn-2Ti après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à différentes doses.	158
Figure 11 : DRX du verre 46S6 après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à différentes doses.....	160
Figure 12 : DRX du verre 46S6-10Zn -2Ti après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à différentes doses.	161
Figure 13 : Variation des concentrations de Ca, de Zn et de Si et du rapport Ca/P entre les différents groupes après 1 mois d'implantation de 46S6 et de 46S6-10Zn-2Ti chez des rattes irradiées.	165
Figure 14 : tissu osseux après 3 semaines d'exposition au rayon gamma	167
Figure 15 : contact intime entre le 46S6 et le tissu osseux.....	168
Figure 16 : Porosité de l'implant 46S6-10Zn2Ti (62%) (A), dégradation du verre bioactif et leur remplacement par un dépôt apatitique (B) et comportement du verre en contact avec le tissu osseux (C).	169
Figure 17 A : Dépôt apatitique dans les pores du verre après 1 mois de leur implantation chez le groupe irradié de 1Gy,.....	170
Figure 17B : Invasion des pores des verres par les cellules osseuses après 1 mois de leur implantation chez les groupes irradiés à 2Gy.....	171
Figure 17C : Invasion des pores des verres par les cellules osseuses après 1 mois de leur implantation chez les groupes irradiés à 4Gy.....	172

Figure 17D: Contacte intime entre le 46S6-10Zn-2Ti et le tissu osseux après implantation chez le groupe irradié à 15Gy.....	173
Figure 18 : Analyses quantitatives par EDS des éléments Ca, P et Zn dans l’interface implants 46S6.....	174
Figure 19 : Analyses quantitatives par EDS des éléments Ca, P et Zn dans l’interface implants 46S6-10Zn-2Ti.....	175
Figure 20 : Spectre MAS-RMN 31C du 46S6 après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.....	176
Figure 21 : Spectre MAS-RMN 31C de 46S6-10Zn-2Ti après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.....	177
Figure 22 : Spectre MAS-RMN 29P du 46S6 après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.....	179
Figure 23: Spectre MAS-RMN 29P de la 46S6-10Zn-2Ti après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.....	180
Figure 24: Spectre MAS-RMN 29Si du 46S6 avant et après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.....	182
Figure 25: Spectre MAS-RMN 29Si du 46S6-10Zn-2Ti avant et après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.....	183

Partie 4

Figure 1 : Etude macroscopique de l’interface os-46S6-10Zn2Ti après 1, 4 et 9 mois d’implantation.....	192
Figure 2A : Radiographie postopératoire.....	193
Figure 2B: Radiographie après 1 mois d’implantation.....	194
Figure 2C: Radiographie après 4 mois d’implantation.....	194
Figure 2D : Radiographie après 9 mois d’implantation.....	195
Figure 3A: CT après 1 mois d’implantation.....	195
Figure 3B: CT après 4 mois d’implantation.....	196
Figure 3C : CT après 9 mois d’implantation montrant la corticalisation du cal et le remodelage osseux.....	196
Figure 4: mCT après 4 mois d’implantation : groupe non implanté (A) et groupe implanté (B et C).....	197

Figure 5A: coupe histologique du tissu osseux du groupe de control (Coloration de Goldner's trichrome)..... 199

Figure 5B: coupe histologique de l'interface Os-46S6-10Zn2Ti après 1 mois d'implantation (Coloration de Goldner's trichrome)..... 200

Figure 5C : coupe histologique de l'interface Os-46S6-10Zn2Ti après 4 mois d'implantation (Coloration de Goldner's trichrome)..... 201

Figure 5D : coupe histologique de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti après 9 mois d'implantation (Coloration de Goldner's trichrome)..... 202

Figure 6 : Interface Os-46S6-10Zn-2Ti, analyse par MEB après 1 mois (A) 4 mois (B) et 9 mois (C) après implantation 203

Figure 7A : Rapport Ca/P de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti, analyse par EDS après 1, 4 et 9 mois d'implantation..... 204

Figure 7B : Analyse quantitative des taux de silicium (Si) et de Zinc (Zn) de l Os-46S6-10Zn2Ti, par EDS après 1, 4 et 9 mois d'implantation..... 205

Figure 8: Analyse structurale de l'Os-46S6-10Zn-2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation par la diffraction des rayons X (DRX) 206

Figure 9: Analyse de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation par la spectrométrie d'infrarouge (FTIR)..... 208

Figure 10: MAS-RMN ²⁹Si de l'interface Os-46S6-10Zn2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation 210

Figure 11: MAS-RMN ³¹P de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation 212

Liste des Tableaux

Rappel bibliographique

Tableau 1 : Présentation des bisphosphonates en fonction de leurs rôles biologiques.....57

Methodologie

Tableau 1 : Compositions de Ca-SBF et P-SBF.....63

Tableau 2 : Mode opératoire du dosage de l'activité de la SOD.....85

Tableau 3 : Mode opératoire du dosage de l'activité de la Catalase.....87

Tableau 4 : Mode opératoire du dosage de l'activité de la GPx.....89

Résultats et Discussions

Partie 1

Table 1 : Résultats de la déconvolution des spectres MAS-RMN ^{29}Si de 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.....108

Table 2 : Résultats de la déconvolution des spectres MAS-RMN ^{31}P de 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.....110

Partie 2

Tableau 1 : Représente les longueurs d'ondes des bandes situées à la surface du verre pur et des composites 46S6-xRIS après 1 jour d'immersion dans le SBF.....125

Tableau 2 : Représente les longueurs d'ondes des bandes situées à la surface du verre pur et des composites 46S6-xRIS après 15jours d'immersion dans le SBF.....127

Tableau 3 : Longueurs d'ondes des bandes situées à la surface du verre pur et des composites 46S6-xRIS après 30 jours d'immersion dans le SBF.....129

Tableau 4 : Modes de vibration des groupements PO_4^{3-} présents dans les composites 46S6 et 46S6-8RIS après 30 jours d'immersion dans le SBF.....141

Partie 3

Tableau 1 : Variation des taux sériques des paramètres hématologiques.....146

Liste des Abréviations

- OH** : Radical hydroxyle
- 1,25(OH) 2D**: Calcitriol,
- 46S6-10Zn-2Ti** : Vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane
- 46S6-xRIS** : Verres bioactifs associés au risédronate
- BCP** : Phosphates de calcium biphasés
- BMU**: Basal Multicellular Unit
- BP**: Bisphosphonates
- CAT**: Catalase
- COLL I**: collagène I
- Complexe IV**: Cytochrome c oxydase
- DHLA**: Acide dehydrolipoïque
- DMEM**: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMO** : Densité minérale osseuse
- DRX**: Diffraction des rayons X
- DTNB** : Ditrinitrobenzoate
- Eahy 926**: Cellules endothéliales
- EDTA** : Ethylène Diamine Tetraacétique Acide
- EHBP**: Etidronate
- ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- FCF**: Fast green
- FPPS**: Farnesyl pyrophosphate synthase
- GB** : Globule blanc
- GLA** : Trois acides α -carboxyglutamiques
- GPx** : Glutathion peroxydase
- GR** : Globule rouge
- GR** : Glutathion Reductase
- GSH** : Glutathion réduit
- GSSG**: Glutathion oxydé
- GTP**: Guanosine triphosphate
- HAC** : Hydroxapatite carbonate
- HB** : Hémoglobine
- Ht** : Hématocrite

ICP-OES: Emission optique torche à plasma
IR/FTIR: Spectrométrie infrarouge
LA : Acide lipoïque
LOO• : Radical peroxyde lipidique
LOOH : Hydroxyle lipidique
LPO: Peroxydation lipidique
MAS-RMN: Résonance magnétique nucléaire
MDA : Malondialdéhyde
MEB-EDS: Microscopie électronique à balayage couplé avec microanalyse – spectrométrie en énergie
NFS: Numération Formule Sanguine
O2•- : Radicaux superoxyde
OC: Ostéocalcine
OP: Ostéopontine
PAL: Phosphatase alcaline
PHGPx : Phospholipide-hydroxyle glutathion peroxydase
PTH: Parathormone
RIS: Risédronate
ROO•- : Radicaux peroxydes
ROS: Espèces réactives oxygénées
SBF: Simulated body fluids
SERMs: Specific Estradiol Receptor Modulator
SOD: Superoxyde dismutase
SRB: SulfoRhodamine B
β-TCP : Phosphate tricalcique β
TBA : Acide thiobarbiturique
TCA: Acide trichloracétique
TGFβ: Transforming Growth Factor β
VEGF: Facteur de croissance vasculaire endothéliale
Vitamine C : Acide ascorbique
Vitamines E : α-tocophérol

Introduction générale et problématique

Le tissu osseux est un tissu de soutien caractérisé par une matrice extracellulaire calcifiée. Cette caractéristique le rend opaque aux rayons X, ce qui permet l'analyse morphologique des os, *in vivo*, par la radiographie ou la tomодensitométrie (Scanner). Cette matrice extracellulaire calcifiée possède des propriétés qui permettent au tissu osseux d'assurer de multiples fonctions. Le tissu osseux possède une fonction métabolique (99% de la réserve de calcium) que l'organisme peut mobiliser par résorption, selon ses besoins. En outre, Il assure la fonction mécanique. Les pertes osseuses peuvent être induites par des traumatismes ou par certaines pathologies, altérant ainsi une ou plusieurs fonctions du tissu osseux. Les chirurgiens tentent de remédier à ces problèmes par un comblement ou une substitution du site osseux endommagé par des matériaux synthétiques. Les matériaux à vocation médicale, utilisés pour la réalisation d'implants ou de dispositifs médicaux, représentent alors un challenge pour l'avenir : accroître la qualité de vie des personnes souffrant de maladies osseuses et faire face au vieillissement de la population mondiale. Les matériaux de substitution d'origine synthétique sont de plus en plus sollicités, car ils présentent une sécurité clinique que ne peuvent offrir les greffes osseuses naturelles. Ils doivent être biocompatibles et dotés de propriétés mécaniques et physico-chimiques leur permettant d'éviter tout risque d'intolérance ou de rejet par l'organisme.

Le domaine des biomatériaux est un domaine pluridisciplinaire faisant intervenir des chirurgiens, des chimistes, des biologistes et des physiciens. Ils sont amenés à travailler en étroite collaboration permettant ainsi à la médecine de continuer à progresser dans le domaine des substituts osseux.

Le problème scientifique majeur posé pour cette communauté scientifique multidisciplinaire est la recherche de moyens d'améliorations de la fiabilité de ces substituts osseux.

Dans ce cadre, nous nous sommes proposés au cours de ce travail, de synthétiser des biomatériaux sous forme de verres bioactif poreux dopés avec des produits d'améliorations comme le zinc, le titane, le risédronate,... et de les tester *in vitro* et *in vivo* sur un modèle animal ostéoporotique (rattes irradiées) et un modèle animal à perte osseuse induite (lapins)

Le Zinc est connu par son rôle dans de nombreuses fonctions biologiques, comme les réactions enzymatiques (il participe à plus de 300 réactions), la synthèse de protéines ou encore l'activité hormonale [Ito *et al*, 2002]. En effet, l'association de zinc avec un biomateriau a augmenté la prolifération ostéoclastique [Mosbahi *et al*, 2016], aussi, le dopage du verre bioactif par le zinc joue un rôle important dans la multiplication cellulaire de l'os [Oudadesse *et al*, 2011]

Le Titane est connu par ses propriétés biologiques et mécaniques dans le domaine de la reconstruction osseuse [Yang *et al*, 2014].

Les bisphosphonates (PBs) sont des molécules qui sont synthétisées à partir des pyrophosphates par le changement de l'atome d'hydrogène par un atome de carbone afin de stabiliser ces molécules à l'hydrolyse. Les BP inhibent la résorption osseuse par la fixation de façon sélective sur l'hydroxyapatite de la phase minérale du tissu osseux. Ils possèdent 3 générations : dans la 3^{ème} génération on signale le risédronate. Ce dernier possède une activité physiologique très intéressante (anti ostéoporotique)

Dans notre étude nous avons cherché aussi à développer un biomatériau poreux. En effet en ingénierie tissulaire 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. Dans ce travail nous avons utilisé un matériau poreux par l'ajout de nitrate de titane. L'évaporation de l'azote suite au traitement thermique crée la porosité dans notre composite.

Afin d'évaluer la biocompatibilité, l'ostéointégration et l'effet anti ostéoporotique de ces matériaux et répondre à nos objectifs, nous avons orienté notre travail de thèse vers l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de ces deux composites : un verre associé au risédronate et une vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane.

Pour se faire, nous avons consacré une partie pour optimiser les meilleurs conduits de synthèse d'un biomatériau hybride « verre bioactif associé au risédronate » avec des tests sans cellules dans un premier temps et dans un deuxième temps nous avons utilisé un biomatériau à porosité expansée « une vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane » pour tester son effet dans la reconstitction d'un tissu osseux trabéculaire et dans les processus de bioconsolidation à travers deux modèles d'animaux: rattes ostéoporotiques après exposition à des rayons gamma et lapins à pertes osseuses induites

Ainsi, ce travail de thèse est présenté dans ce mémoire selon le plan suivant :

Introduction générale et problématique

Un rappel bibliographique qui élucide les notions essentielles concernant les tissus osseux, la physiopathologie des tissus osseux tels que l'ostéoporose, les biomatériaux, l'effet de certaines molécules bioactives sur la régénération osseuse ainsi que l'effet du stress oxydant sur l'ostéoporose au niveau du site osseux.

La méthodologie qui est consacrée à la description des matériaux élaborés et des méthodes d'analyses pour l'étude du comportement des 2 biomatériaux qui sont : des verres bioactifs associés au risédronate (46S6-xRIS) et une vitrocéramique poreuse dopée au zinc et

au titane (46S6-10Zn-2Ti). Pour ces deux biomatériaux nous avons développé les études *in vitro* en l'absence des cellules ainsi que l'étude *in vivo* chez deux modèles d'animaux : les rattes ostéoporotiques et les lapins avec des pertes osseuses induites,

Les résultats sont présentés en 4 parties : Concernant les synthèses des biomatériaux et les différentes explorations biologiques et physico-chimiques

Rappel bibliographique

I-Tissu osseux

I-1- Généralités sur le tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif composé de cellules d'origine mésenchymateuse. Il est en remaniement permanent et assure plusieurs fonctions parmi lesquelles nous citons :

➤ **Biomécanique**

L'os est à la fois solide et résistant mais aussi, dans une certaine mesure, élastique. Ces propriétés mécaniques lui permettent de supporter les effets de la pesanteur, de résister aux contraintes mécaniques externes, ainsi qu'aux forces des contractions musculaires

➤ **Protecteur**

Le système nerveux central est protégé par la boîte crânienne et les vertèbres.

➤ **Métabolique**

Le Tissu osseu possède un rôle métabolique en offrant le maintien de l'équilibre phosphocalcique. En effet, le squelette renferme 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme jouant ainsi un rôle biologique prépondérant dans la vie cellulaire, la transmission nerveuse et la coagulation sanguine [Mosbah et Andrelli 2012].

➤ **Hématopoïétiques**

La moelle osseuse contient les cellules hématopoïétiques, au sein de l'os spongieux, c'est le lieu de fabrication des cellules sanguines.

I-2- Différents types d'os

Il existe différents types d'os: l'os long (comme le tibia ou le fémur), l'os court (comme l'os du carpe ou la vertèbre) et l'os plat (comme l'omoplate ou le bassin). L'os long est un tissu composé de deux parties : une partie épiphysaire spongieuse et une partie diaphysaire corticale (Figure 1). Entre ces deux parties on peut décrire la métaphyse qui sépare l'épiphysaire de la diaphysaire et elle est faite de tissu spongieux.

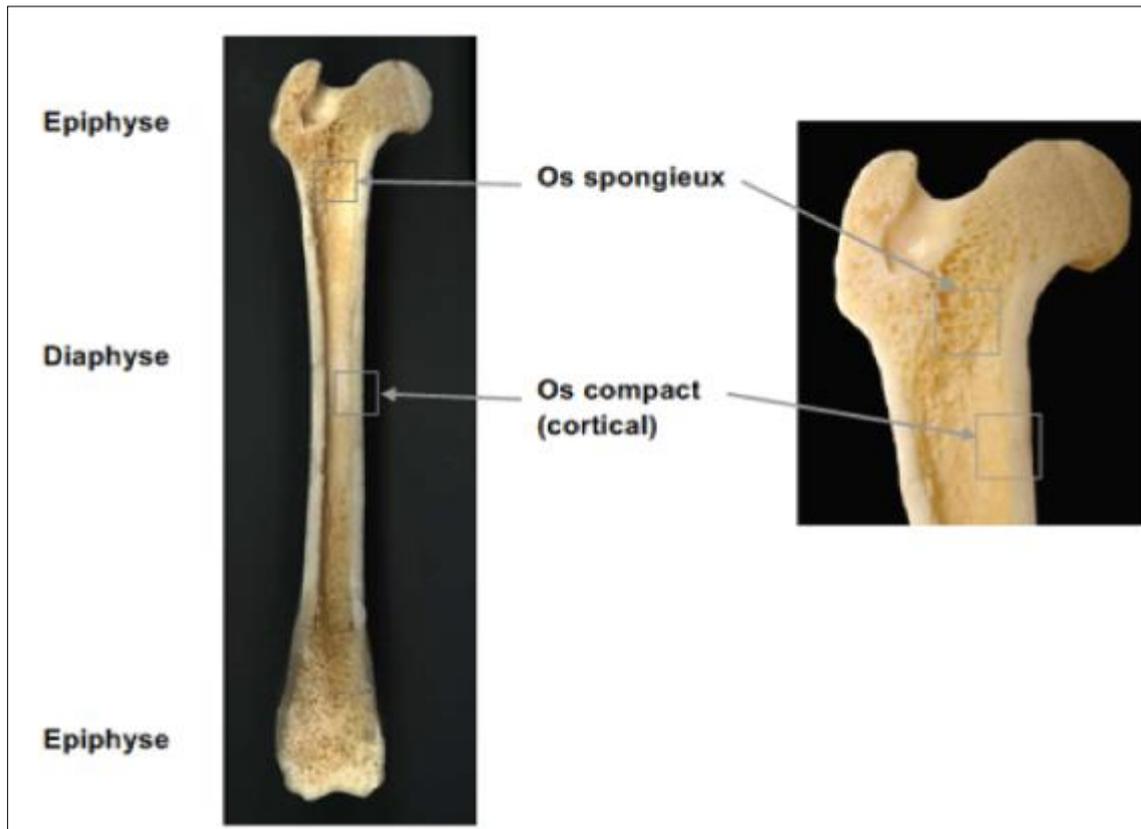


Figure 1: Répartition de l'os compact et spongieux dans un os long.

L'os cortical, également appelé os compact ou os lamellaire, correspond à la diaphyse de l'os long, c'est-à-dire à sa partie médiane. Il représente également l'enveloppe des os courts. L'os cortical est constitué par une multitude d'ostéons de forme cylindrique qui se succèdent de manière parallèle à la diaphyse. Ces ostéons sont composés par des lamelles osseuses et sont traversés par le canal de Havers. Ce canal central contient du tissu conjonctif qui présente la spécificité d'être extrêmement vascularisé. Les ostéons sont centrés par les canaux de Havers qui eux-mêmes sont reliés entre eux par les canaux de Volkmann [Wang *et al*, 2010a] (Figure 1 et Figure 2).

L'os trabéculaire constitue les épiphyses et les métaphyses des os longs et remplit la partie intérieure des os plats et des os longs. Il est constitué de lamelles ou trabécules osseuses disposées de façon non concentrique autour de cavités ou aréoles, remplies de moelle osseuse rouge donnant un aspect d'éponge (Figures 1 et 2). Il est présent dans les vertèbres et le bassin il leur assure une bonne résistance à la compression ainsi qu'une flexibilité si nécessaire [Melton *et al*, 2005].

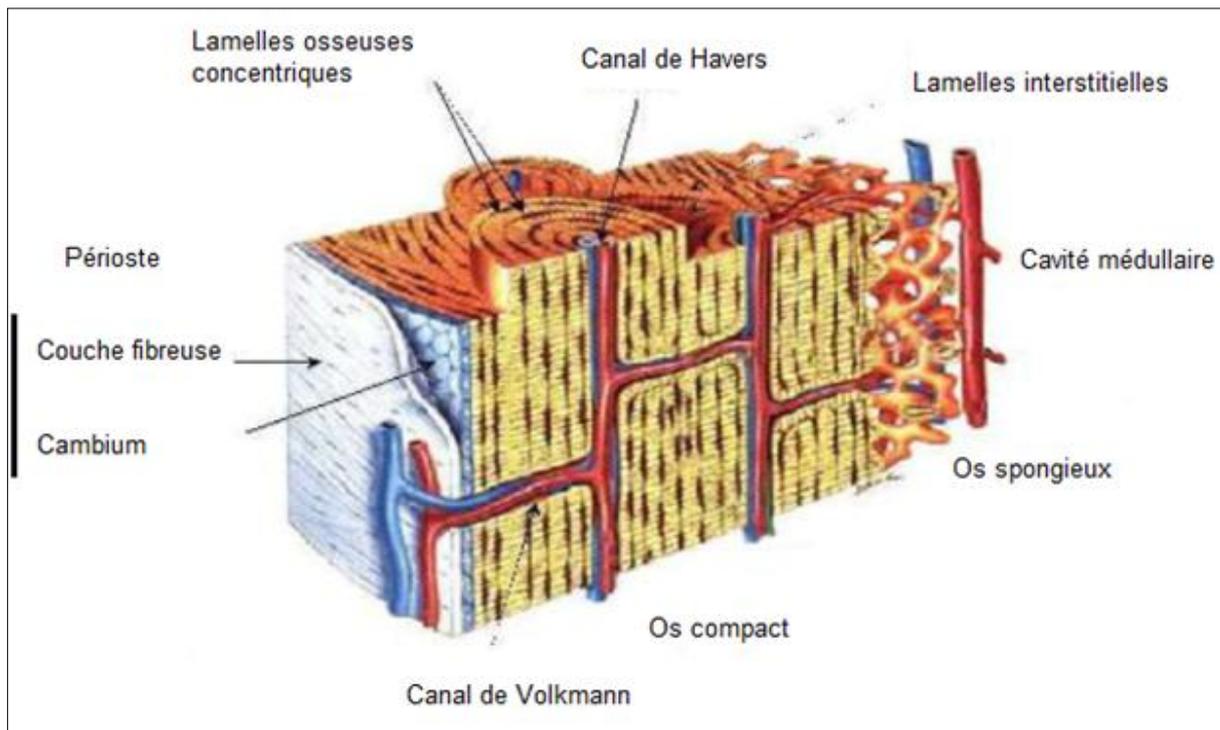


Figure 2: Aspect structural de l'os compact et de l'os spongieux [Toppets et al ,2004]

I-3-Composition de l'os

L'os est composé d'une matrice extracellulaire organique, matrice extracellulaire minérale et des cellules :

I-3-1- Matrice extracellulaire

Elle est composée de deux phases, une phase organique favorisant l'élasticité de l'os, celle-ci est composée de fibres de collagènes et de substances fondamentales (ostéopontine, ostéocalcine, fibronectine et protéoglycane) ainsi qu'une phase minérale fournissant à l'os sa dureté, elle constitue un réservoir des minéraux.

a- Matrice organique

Elle assure l'élasticité de l'os et est composée des fibres de collagènes et des cellules.

Fibre de collagène I

Le collagène est une glycoprotéine fibreuse rigide en forme de tresse à trois brins de longueur 3000Å et de diamètre 50Å, riche en proline et hydroxyproline. Le collagène est

synthétisé sous la forme de tropocollagène (3000Å de long) constitué de trois sous unités de 2 chaînes alpha 1 et d'une chaîne alpha 2. Cinq molécules de tropocollagène sont ensuite agencées en microfibrilles ordonnées séquentiellement en longueur avec une période de 640Å. Une fibrille est ensuite constituée par un assemblage régulier de microfibrilles de 100 à 300Å de diamètre visibles au microscope électronique sous la forme d'une alternance de bandes sombres et de bandes claires. Enfin la fibre collagénique est un agrégat de fibrilles en forme de ruban visible au microscope optique (Figure 3)

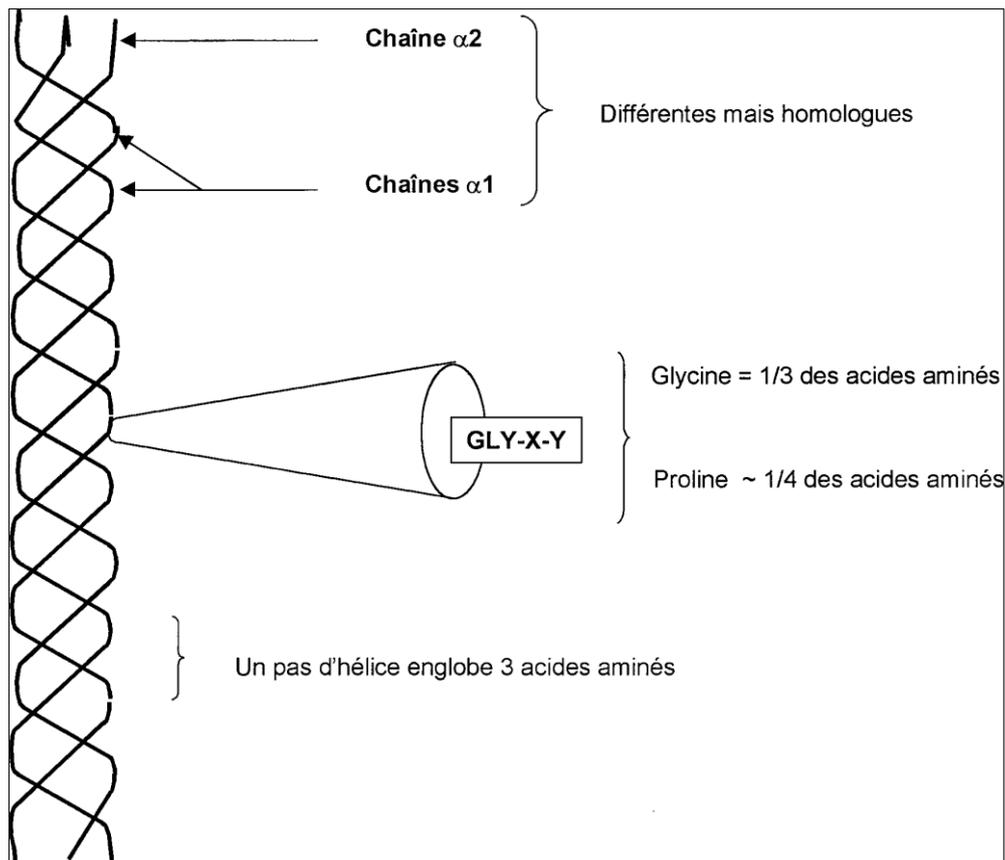


Figure 3: Structure d'une fibre de collagène de type I.

➤ **Substances fondamentales**

Elles participent à la formation de la matrice protéique du tissu osseux qui assure la synthèse du tissu ostéoïde. Elles représentent les protéines non collagéniques et constituent de 10-15% des protéines osseuses. Parmi ces protéines on distingue :

➤ **Ostéocalcine**

C'est une protéine non collagénique de la matrice osseuse. Elle est le reflet de l'activité ostéoblastique. C'est donc un marqueur de la formation osseuse, comme la

phosphatase alcaline osseuse et les propeptides C- et N-terminaux du collagène de type 1 qui constitue 90 % du collagène d'un vertébré aussi la trame de l'os (à comparer aux armatures du béton armé) et plus généralement des tissus conjonctifs. Il se trouve dans les os, la peau, les tendons, la cornée et les organes internes. L'ostéocalcine est un petit peptide de 49 acides aminés, disposés en une seule chaîne. Elle est exclusivement synthétisée par les ostéoblastes matures sous l'action du calcitriol (1,25(OH) 2D). Les ostéoblastes synthétisent la matrice osseuse, constituée de collagène de type 1 et de protéines non collagéniques, dont l'ostéocalcine grâce à certaines enzymes dont la phosphatase alcaline osseuse (PAL). Sa synthèse dépend également de la vitamine K pour la carboxylation des trois acides α -carboxyglutamiques (GLA) en position 17, 21 et 24. Ces résidus GLA confèrent à l'ostéocalcine une forte affinité pour l'hydroxyapatite (matrice extra-cellulaire de l'os), mais également une structure tertiaire plus ou moins compacte selon la richesse en calcium. La majeure partie de l'ostéocalcine est incorporée dans l'os. Une faible proportion est relarguée dans la circulation et peut être ainsi mesurée. Dans le « turn-over » osseux, où formation et résorption sont couplées, elle est le témoin du niveau de formation de l'os. La demi-vie de l'ostéocalcine native est brève (5 minutes environ). Elle est rapidement métabolisée dans le foie puis éliminée par les reins.

➤ **Ostéonectine**

C'est une protéine d'adhérence de la substance préosseuse du tissu osseux intervenant dans la minéralisation par son affinité pour le collagène I et le calcium.

➤ **Sialoprotéines (ostéopontine)**

Dans l'os, cette protéine est produite par les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes [Dodds *et al*, 1995] ; on la retrouve aussi dans le cartilage hypertrophique de la plaque de croissance [Landis *et al*, 2003]. La présence de cette protéine dans différents organes (l'os, la dentine, les glandes mammaires, le rein, le cerveau, les ganglions de l'oreille interne) et sa sécrétion par les cellules épithéliales dans de nombreux liquides biologiques (la bile, le sang, l'urine, le lait et le liquide séminal) suggèrent qu'elle est à la fois une molécule structurale, un facteur humoral et une cytokine [Denhardt *et al*, 2001]. Elle est localisée dans les interfaces matrice-cellules et matrice-matrice [McKee *et al*, 1996], l'ostéopontine sert à l'attachement des cellules à l'hydroxyapatite de la partie minérale de l'os, adhérant au minéral par sa région poly-aspartate et aux intégrines et CD44 du côté cellulaire.

➤ **Protéines d'adhésion (Fibronectines)**

Glycoprotéines adhésives ubiquitaires impliquées dans les liaisons intracellulaires. Ces protéines sont présentes à la surface des cellules, dans le plasma et dans le liquide amniotique. Ce sont des macromolécules dimériques de masse moléculaire 440 kDa, dont le gène est situé sur le chromosome 2.

➤ **Protéoglycanes**

Un protéoglycane est un glycoconjugué constitué d'une protéine liée à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycane peut atteindre 95% du poids moléculaire de la molécule. Les protéoglycanes sont produits par glycolysation de protéines au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Ils sont soit intégrés à la membrane plasmique, soit excrétés.

b- Matrice minérale

La matrice minérale représente environ 65 % du poids de l'os sec et rend l'os rigide et solide. La minéralisation de cette matrice est assurée essentiellement par des cristaux d'hydroxapatite (ou phosphate tricalcique). (Figure 4)

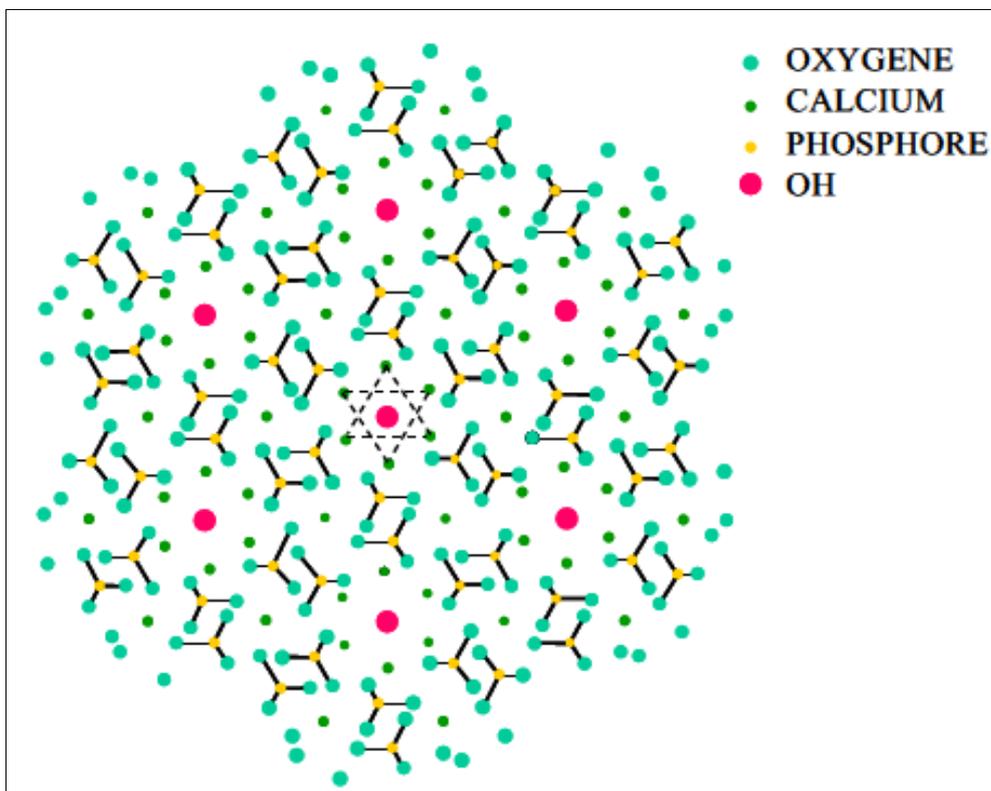


Figure 4: Projection de la structure de HA sur le plan de base (001).

I-3-2-Matrice cellulaire

Ils existent deux lignées qui assurent la formation et la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse en mettant l'équilibre entre la phase de formation (par le biais des ostéoblastes) et la phase de résorption (par le biais des ostéoclastes)

Lignée ostéoblastique

Préostéoblastes

Situées au contact des ostéoblastes matures, ces cellules allongées sont issues de précurseurs mésenchymateux communs aux fibroblastes, aux chondrocytes et aux adipocytes.

Ostéoblastes

Elles sont présentes dans le tissu osseux sous forme d'une couche monocellulaire ou pluricellulaire au contact de la substance ostéoïde (Figure 5). L'ostéoblaste est une cellule de 7 à 10 μm [Martin *et al*, 1993]. Son cytoplasme est riche en réticulum endoplasmique granuleux et en ribosomes ce qui explique l'aspect basophile de cette cellule à la coloration. La présence de ces organites permet la synthèse d'un grand nombre d'éléments parmi lesquels la trame protéique du tissu osseux et des protéines non collagéniques non structurales. Ces protéines non collagéniques ont des fonctions importantes vis-à-vis de la biologie de l'os et en particulier concernant la minéralisation de la matrice. On note aussi la présence de microtubules et de microfilaments qui permettent à la cellule de se déplacer au sein de la matrice osseuse [Martin *et al*, 1993]. L'ostéoblaste joue également un rôle de régulation et d'information à la surface de l'os [Shuto *et al*, 1997]. On a pu mettre en évidence l'existence de communications entre les ostéoblastes adjacentes et les ostéocytes grâce à des expansions cytoplasmiques circulant dans des canalicules osseux qui permettent la transmission de signaux chimiques et électriques [Frayssinet *et al*, 1994].

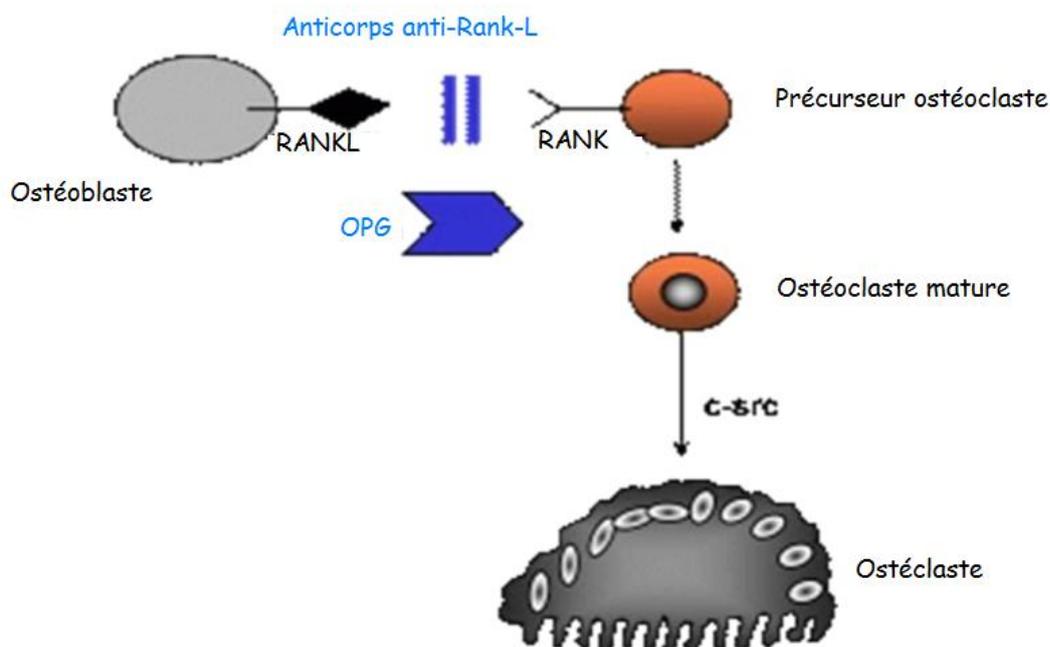
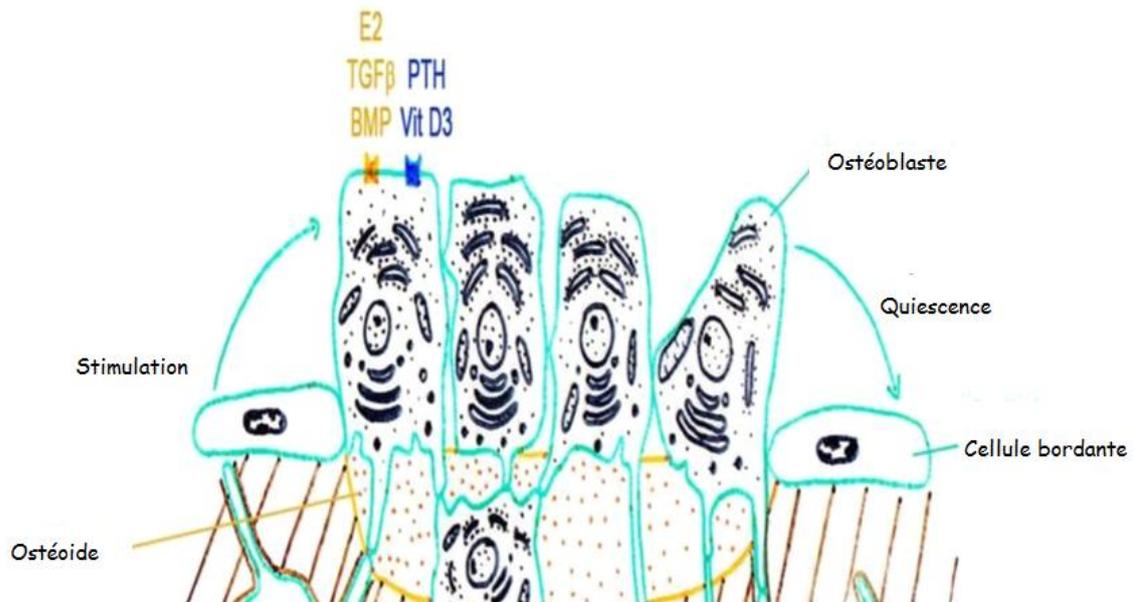


Figure 5: Facteur agissant sur la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes [Fleisch *et al*, 1998]

Ostéocytes

Ce sont des ostéoblastes qui ont perdu leur alignement avec les autres ostéoblastes suite à la diminution de leur activité de synthèse et qui se retrouvent emmurées dans une logette osseuse de la matrice extracellulaire. Elles gardent des contacts cytoplasmiques avec les autres cellules de l'os. On a longtemps considéré que l'ostéocyte était une cellule quiescente et inactive puisqu'elle n'était plus capable de se diviser. Aujourd'hui, cette idée a été abandonnée et de nombreuses hypothèses ont été envisagées [Frayssinet *et al*, 1994].

L'ostéocyte pourrait jouer un rôle dans la régulation phosphocalcique entre l'os et le sang et de ce fait contrôler la maturation de la matrice extracellulaire [Frayssinet *et al*, 1994]. Une autre hypothèse avancée est que comme l'ostéocyte est une cellule mécanosensible, elle pourrait synthétiser localement des facteurs de régulations qui permettraient un remaniement osseux sous l'effet de contraintes mécaniques auxquelles l'os est exposé [Lanyon *et al*, 1993].

Cellules bordantes

C'est une autre partie des ostéoblastes qui ont accompli sa fonction d'ostéogénèse se transforme en cellules bordantes. Ce sont des cellules plates et allongées qui se trouvent à la surface de l'os à l'état quiescent. Les cellules bordantes sont alignées sur une couche de matrice osseuse non minéralisée. Il a été proposé l'hypothèse que ce sont les cellules bordantes qui envoient un signal aux prés ostéoclastes pour leur localisation dans l'os. Les cellules bordantes agissant sur un signal des ostéocytes, seraient capables de déterminer le besoin de remodelage en un lieu et un temps spécifiques [Manolagas *et al*, 2000 ; Parfitt *et al*, 1996].

b- Lignée ostéoclastique

Ostéoclastes

Ce sont des cellules de grande taille (50 à 100 µm), multinuclées (2 à 8 noyaux) suite à la fusion de précurseurs mononucléés (figure 6). Cette cellule peut être observée isolée ou en petit nombre sur un site osseux donné à un moment donné [Teitelbaum *et al*, 1996]. Sa forme est variable d'autant qu'elle est capable de se déplacer sur le tissu osseux. L'ostéoclaste est une cellule bipolaire chez laquelle on distingue un pôle informatif et un pôle fonctionnel. Le pôle informatif et régulateur regroupe de nombreux récepteurs membranaires capables de réguler l'activité de la cellule. L'ostéoclastogénèse est modulée par des signaux biologiques comme certaines hormones et des cytokines (parathormone (PTH), calcitonine, 1-25 di-OH vitamine D3, IL-1, IL-2...) [Teitelbaum *et al*, 1996]. De plus, on sait que l'activation des ostéoclastes nécessite la présence et la médiation des ostéoblastes [Chambers *et al*, 1993].

Il est caractérisé par la présence d'une bordure en brosse. L'organisation de la membrane cytoplasmique en brosse est temporaire et représente une spécificité de l'ostéoclaste [Teitelbaum *et al*, 1996]. Ce pôle assure la résorption osseuse grâce à la libération au niveau des replis membranaires d'enzymes lysosomiales (collagénases, phosphatases...) et de protons qui vont dégrader la matrice minéralisée en milieu acide.

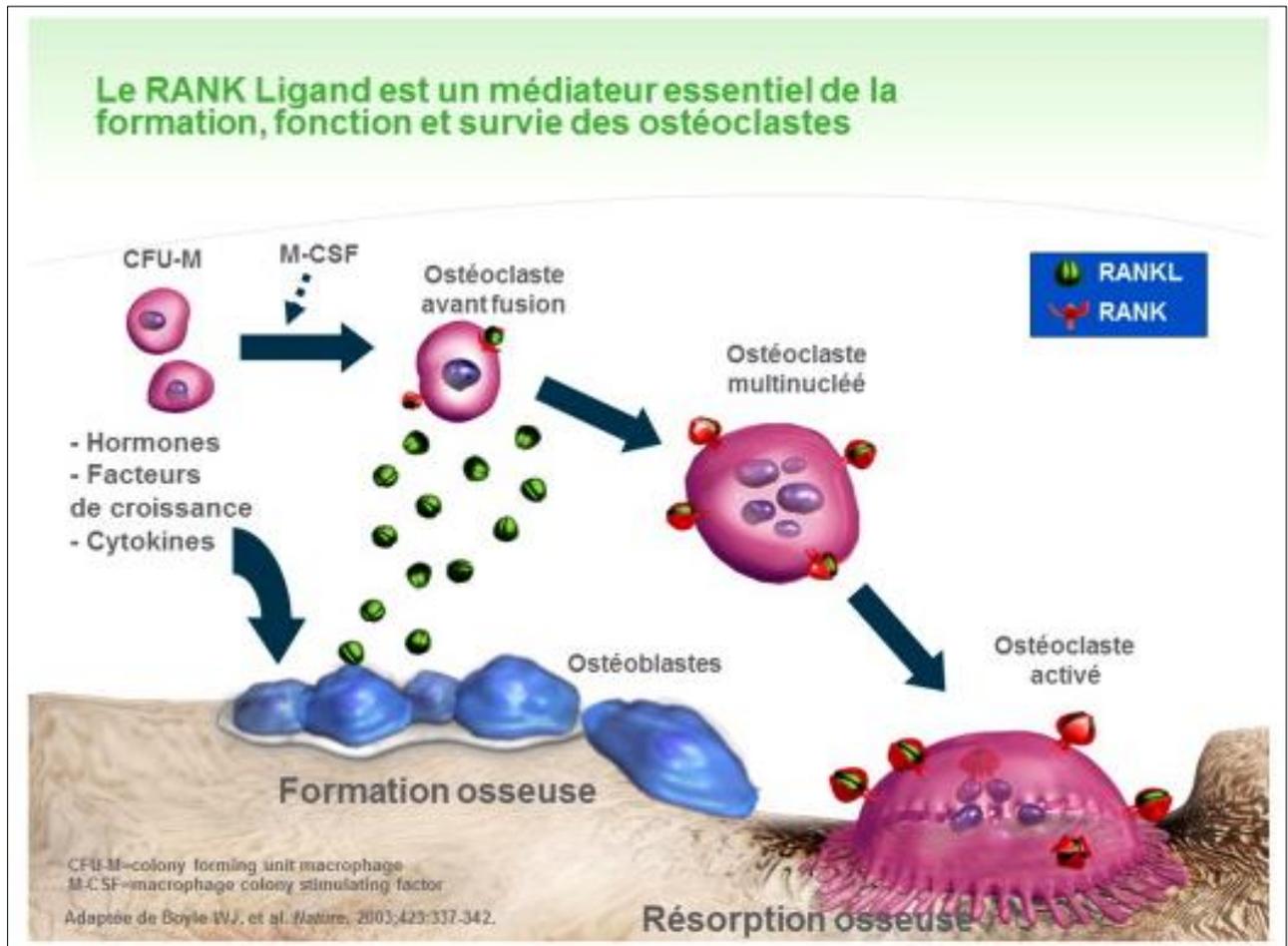


Figure 6: Processus de formation des ostéoclastes

I-4- Remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus physiologique qui assure le renouvellement du tissu osseux à travers la résorption de l'os ancien et son remplacement par un nouveau tissu qui va être secondairement minéralisée impliquant les différents types cellulaires du tissu osseux [Roux *et al*, 2010]. Chaque cycle de remodelage contient plusieurs phases (une phase d'activation, phase de résorption puis inversion, phase de formation et enfin la phase de quiescence), il dure 4 mois et la durée de la formation osseuse est plus longue que celle de la résorption (Figure 7).

Phase d'activation

L'os cortical diaphysaire est exposé aux contraintes de compression qui induisent l'accumulation d'endommagement. En compression, l'endommagement se manifeste plutôt

sous la forme de fissures et microfissures (cracks et microcracks) observables au microscope optique et de longueur variant entre 10 et 300 μm . Les ostéocytes sont très sensibles aux stimuli mécaniques, notamment à l'endommagement de l'os cortical. Les cellules mécanosensibles ostéocytaires sont activées via ces divers stimuli environnants notamment, et par exemple, lorsque leurs déformations dues aux champs mécaniques locaux dépasseront un certain seuil. Elles vont alors envoyer différents messages chimiques et /ou électriques pour activer la différenciation des cellules souches du sang (cellules hématopoïétiques) ou de la moelle osseuse (cellules mésenchymateuses) en futures cellules osseuses : les ostéoclastes et les ostéoblastes.

Phase de résorption

À la surface du tissu osseux, une fois que les cellules bordantes éliminent la fine couche de collagène sur laquelle elles reposaient et les ostéoclastes prennent la relève pour éroder, l'os sous-jacent progresse de proche en proche pour créer une zone creuse de résorption appelée la lacune de « Howship ».

Phase d'inversion

Quand les ostéoclastes finissent de creuser la lacune, elles meurent par apoptose et sont remplacées par des cellules mononuclées de nature imprécise pour lisser le fond de la lacune.

Phase de formation

Les ostéoblastes se différencient localement et commencent d'apposer les premières lamelles de tissu ostéoïde pour élaborer une nouvelle unité de structure qui vient combler la zone résorbée par les ostéoclastes.

Phase de quiescence

À la fin de la synthèse de la nouvelle unité de structure (BMU : Basal Multicellular Unit), les cellules osseuses entrent en phase de repos jusqu'au prochain cycle. Pendant cette phase certaines ostéoblastes s'emmurent et deviennent des ostéocytes et d'autres freinent leurs activités, s'aplatissent et deviennent des cellules bordantes.

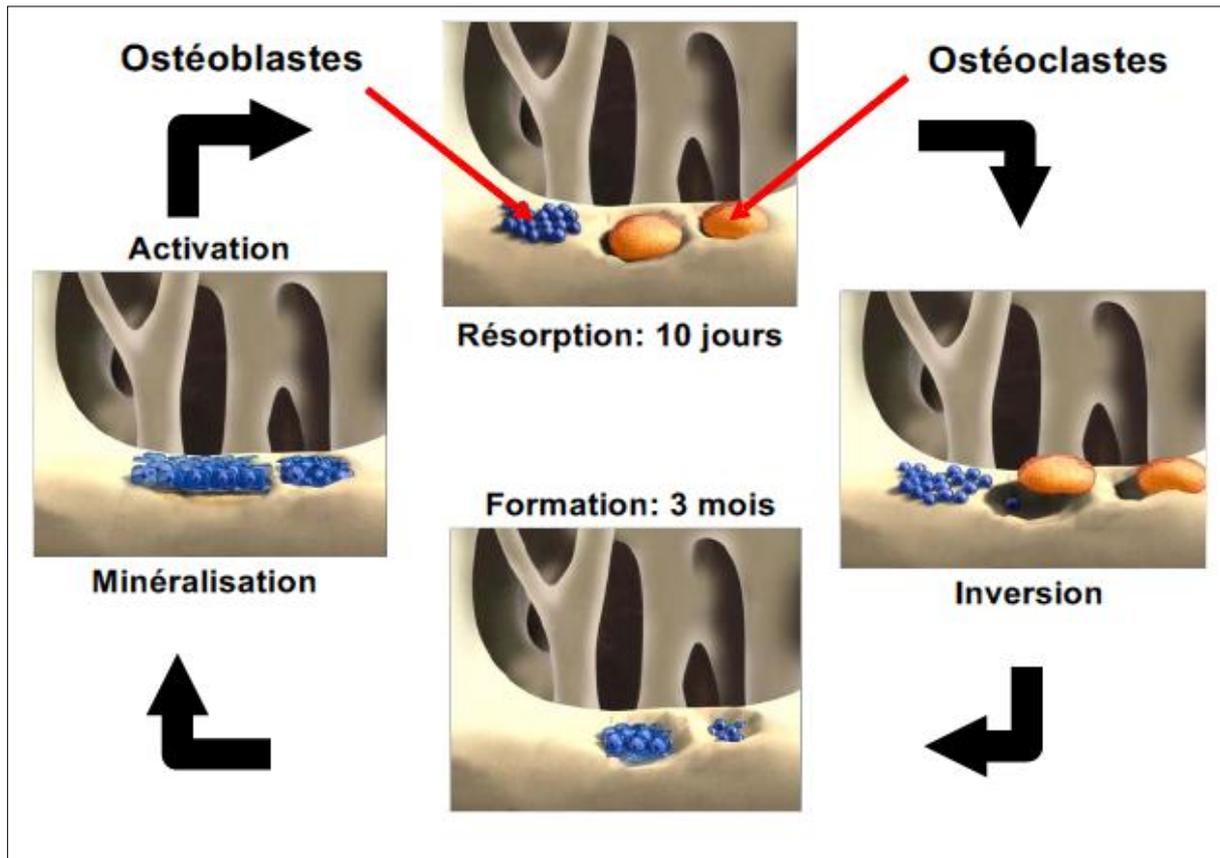


Figure 7: Les différentes phases de remodelage osseux

I-5- Troubles osseux

I-5-1- Notion d'ostéoporose

L'ostéoporose est une anomalie caractérisée par la diminution de la masse osseuse et la détérioration de l'architecture du tissu osseux. Ceci mène à une fragilisation osseuse augmentée, et par conséquent l'augmentation du risque de fractures [Kanis *et al*, 2013] (Figure 8).

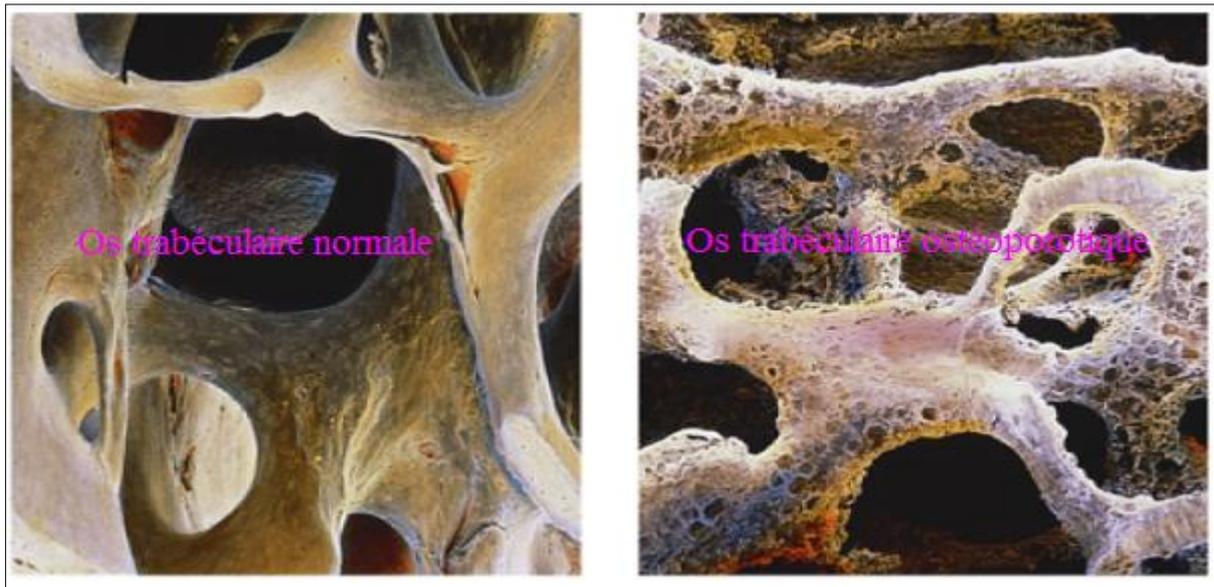


Figure 8: Os trabéculaire normal et os trabéculaire ostéoporotique : Présence de pores dans les trabécules ostéoporotiques (b) [Martini, 2004].

I-5-2- Types d'ostéoporose

Ostéoporose de type 1

Ostéoporose post ménopausique, essentiellement trabéculaire, elle se traduit par des tassements vertébraux et des fractures du radius. Elle est la conséquence d'une carence en œstrogènes. En effet, lorsque les œstrogènes circulants diminuent, une baisse de synthèse de TGF β (Transforming Growth Factor β) et une augmentation de la synthèse de l'IL-6 au niveau de l'os. Cette double action conduit à une augmentation du recrutement d'ostéoclastes matures et à une augmentation de l'activité de résorption osseuse [Roodman *et al*, 1992].

Ostéoporose de type 2

Ostéoporose sénile qui survient dans les 2 sexes. Elle touche l'os trabéculaire et cortical, elle est en relation avec les facteurs liés au vieillissement. Parmi ceux-ci, l'insuffisance en vitamine D et le défaut d'absorption du calcium. Ceci induit un hyperparathyroïdisme secondaire qui stimule la résorption osseuse. Ce type d'ostéoporose est la cause essentielle des fractures du col du fémur.

Ostéoporose de type 3

Touche de manière uniforme les hommes et les femmes. Son mécanisme est non encore élucidé.

I-5-3- Causes d'ostéoporose

A-Age

La perte osseuse débute chez les deux sexes à l'âge de 40 ans [Garnero *et al*, 1996]. Elle est lente, linéaire de l'ordre de 3% par décade, en secteur trabéculaire. Chez la femme, immédiatement après la ménopause, la vitesse de la perte osseuse s'accélère et atteint 2% par an durant 10 ans. Après 60 ans, la perte osseuse se poursuit parallèlement chez les deux sexes. Après 75 ans, elle s'accélère de nouveau, en particulier sur le site fémoral où elle atteint 0,9% par an.

B-Irradiation

Il constitue un facteur essentiel qui participe à la création de l'ostéoporose, pour cela nous l'avons utilisé dans notre travail de thèse comme étant un moyen pour la création d'un modèle animal ostéoporotique

Notion de l'irradiation

L'irradiation est un terme utilisé en médecine pour parler de plusieurs phénomènes. L'irradiation est l'ensemble des rayons lumineux, rayons X ou rayonnements de corps radioactifs, émis par une source. Il s'agit également de l'exposition de tout ou partie d'un organisme à ces rayonnements qui peuvent perturber le fonctionnement des cellules de l'organisme. Elle peut modifier la structure de l'ADN. Face à une irradiation modérée, l'organisme peut se défendre seul. En cas d'irradiation prolongée ou répétée, les cellules se détruisent. Elle peut entraîner différentes pathologies comme un cancer qui peut apparaître des années après l'irradiation initiale. Une irradiation chez la femme enceinte peut causer des malformations fœtales ou des mutations génétiques. Aussi l'irradiation induit la destruction de la trame osseuse et par conséquent la création de l'ostéoporose.

Effets de l'irradiation

Effet direct

Il est déclenché par le passage d'un rayonnement entraînant l'ionisation et l'excitation des atomes et molécules d'un milieu biologique le long des trajectoires des particules ionisantes. Ceci conduit à des perturbations physiques de la molécule produisant ainsi des effets biologiques néfastes. L'effet biologique se manifeste par l'altération de la structure moléculaire essentiellement au niveau de l'ADN. Il s'agit d'un dépôt d'énergie sur la chaîne d'ADN, induisant ainsi sa rupture ou sa cassure.

Éffet indirect

L'effet biologique de l'ionisation se manifeste en grande partie sur l'irradiation des molécules d'eau vue que l'eau représente environ 80% du poids de l'organisme. L'effet biologique de l'irradiation se résume dans la radiolyse de l'eau. La première étape est l'ionisation de l'eau suivit d'une deuxième étape plus rapide conduisant à la formation de produits moléculaires stables et des radicaux libres. Les radicaux libres ont une durée de vie très courte et ils sont très réactifs.

C-Conséquence de rayonnement sur le système biologique

Sur la balance oxydative

Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singlet après activation de photosensibilisants.

➤ Notion du stress oxydatif

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène et dont nos cellules savent normalement se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas des ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes suffisantes pour les éliminer (Figure 9).

➤ Notion de radicaux libres

Ce sont des dérivés instables et toxiques de l'oxygène qui réagissent et dégradent l'ADN, les lipides et les protéines. Des radicaux libres en surnombre auront ainsi un effet visible sur

le vieillissement de la peau et seraient impliqués dans de nombreuses pathologies comme des cancers, des maladies cardiaques, des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, des intoxications à des médicaments, l'ostéoporose etc.

➤ **Types de radicaux libres**

Il y a beaucoup de types de radicaux libres dans le corps. Trois sont particulièrement néfastes, à savoir :

Radical anion superoxyde

Ce radical est obtenu par la capture d'un électron par l'oxygène singulet. Il est produit majoritairement par la chaîne mitochondriale, mais également par les oxydases

Radical hydroxyle

Ce radical libre attaque les enzymes, les protéines et les graisses non saturées des membranes de la cellule.

Radical peroxyde des lipides

Les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) sont des radicaux secondaires issus de l'oxydation de substrats organiques, initiées par l'oxygène singulet ou le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$). Ils sont dotés d'un pouvoir oxydant important mais inférieur à celui de ($\cdot\text{OH}$), avec le même mécanisme d'action que ce dernier. Ils peuvent également se décomposer pour donner des radicaux superoxydes ($\text{O}_2\cdot$). Ils sont à l'origine de réactions en chaîne et la peroxydation des lipides est un exemple d'oxydation très dangereux pour les cellules avec des conséquences multiples en induisant une diminution de la fluidité des membranes plasmiques et une augmentation de la charge négative de surface, et en perturbant les membranes des organites cellulaires. On observe ainsi une inactivation des enzymes membranaires, une oxydation des groupements thiols, une augmentation de la perméabilité membranaire, un gonflement des mitochondries avec inhibition de la chaîne respiratoire et la perte du cytochrome C.

Maille d'oxygène

Techniquement, cette maille d'oxygène n'est pas un radical libre, ce métabolite peut néanmoins créer du dommage au corps.

Systemes anti-oxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS (espèces réactives oxygénées) est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques [Dröge, 2002]

Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Figure 9).

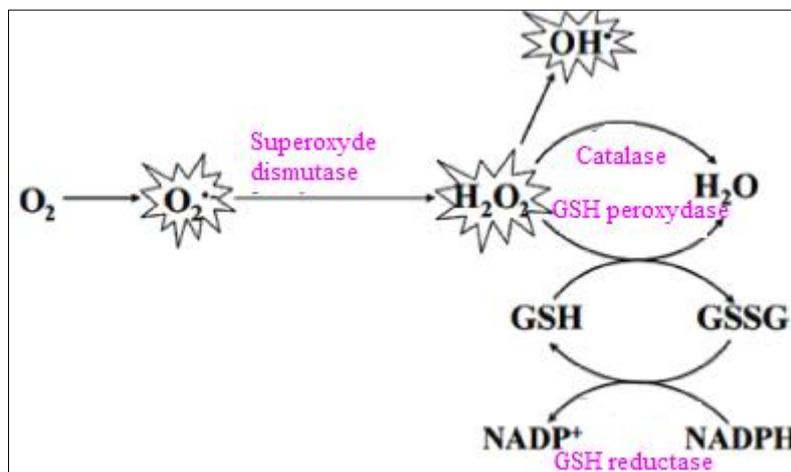


Figure 9: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques

Le Superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par sa localisation cellulaire et par son cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter membranaire [Sturtz *et al*, 2001]. La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris MnSOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations [Huang *et al*, 2001]. Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des

souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vers 180 semaines) [Sentman *et al*, 2006].

Les Glutathions peroxydases (GPx) et reductases (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂. Lors de cette réaction, deux molécules de glutathion réduites (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) [Mates *et al*, 1999]. Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroxyle glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique [Nomura *et al*, 2000]. La glutathion réductase quant à elle a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de la réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

La Catalase

La catalase est également responsable de l'élimination d'H₂O₂ par une transformation en H₂O et O₂. Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l'H₂O₂ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues [Mates *et al*, 1999]. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se trouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydants, nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

Oligoéléments présents dans la matric osseuse

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydants requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de

fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

La Glutathion

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique [Packer *et al*, 1997]. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté [Ji *et al*, 1992].

Ubiquinones et cytochrome c

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant [Power & Lennon, 1999]. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxylys. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS [Packer *et al*, 1997]. Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O₂^{•-} produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV (cytochrome c oxydase) formant du cytochrome c oxydé et de l'H₂O [Skulachev, 1998].

Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer des radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique [Packer *et al*, 2008]. La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'O₂^{•-} et l'OH[•]. Elle peut aussi réduire le radical α - tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Figure 10) [Packer *et al*, 2008].

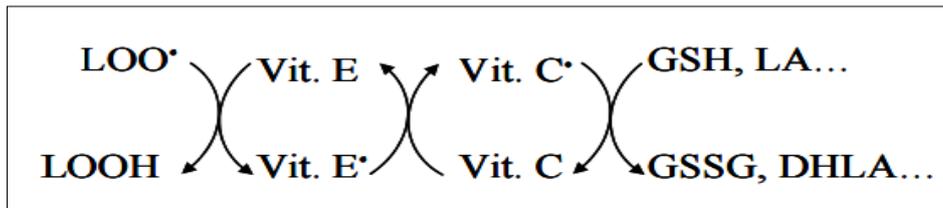


Figure 10: Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. (LOO•) : radical peroxy lipidique, (LOOH) : hydroxyle lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé,

Éffet Sur le tissu osseux

La diminution du tissu osseux après irradiation est une réponse bien étudiée [Baxter *et al*, 2005a]. La réduction de la masse osseuse et la qualité de l'os dépend globalement de plusieurs facteurs, y compris la dose absorbée, l'énergie du faisceau de rayonnement, la taille de la fraction de la dose de rayonnement et de l'âge du patient [Mitchell *et al*, 1998]. La réduction de la masse osseuse après irradiation est le résultat des changements physiologiques au niveau du système vasculaire et des cellules du tissu osseux [Hopewell, 2003; Mitchell *et al*, 1998;]. En effet, la destruction des cellules osseuses (osteoblastes, ostéoclastes et ostéocytes) est responsable de la diminution de la masse et de la densité osseuse [Hopewell, 2003]. La diminution de la prolifération des osteoblastes, du collagène et de la phosphatase alcaline après irradiation a été mise en évidence [Hopewell, 2003]. La diminution de ces marqueurs de remodelage osseux induit la réduction de l'activité de l'ostéoblaste ce qui conduit à l'atténuation de la maturation de la matrice osseuse et altère la minéralisation du tissu osseux. Les fortes doses d'irradiation conduit à la mort des ostéocytes qui sont responsables à la minéralisation du tissu osseux. Alors que l'effet de l'irradiation sur le tissu osseux reste encore discrète, en effet, aucun changement ni dans la fonction ni dans le nombre des osteoclastes n'a été détecté après irradiation [Sawajiri *et al*, 2003]. La diminution du nombre des osteoblastes et la persistance de leur nombre conduit à l'apparition d'un déséquilibre entre les processus de formation et les processus de résorption ce qui conduit par conséquent à la création de l'ostéoporose (Figure 11).

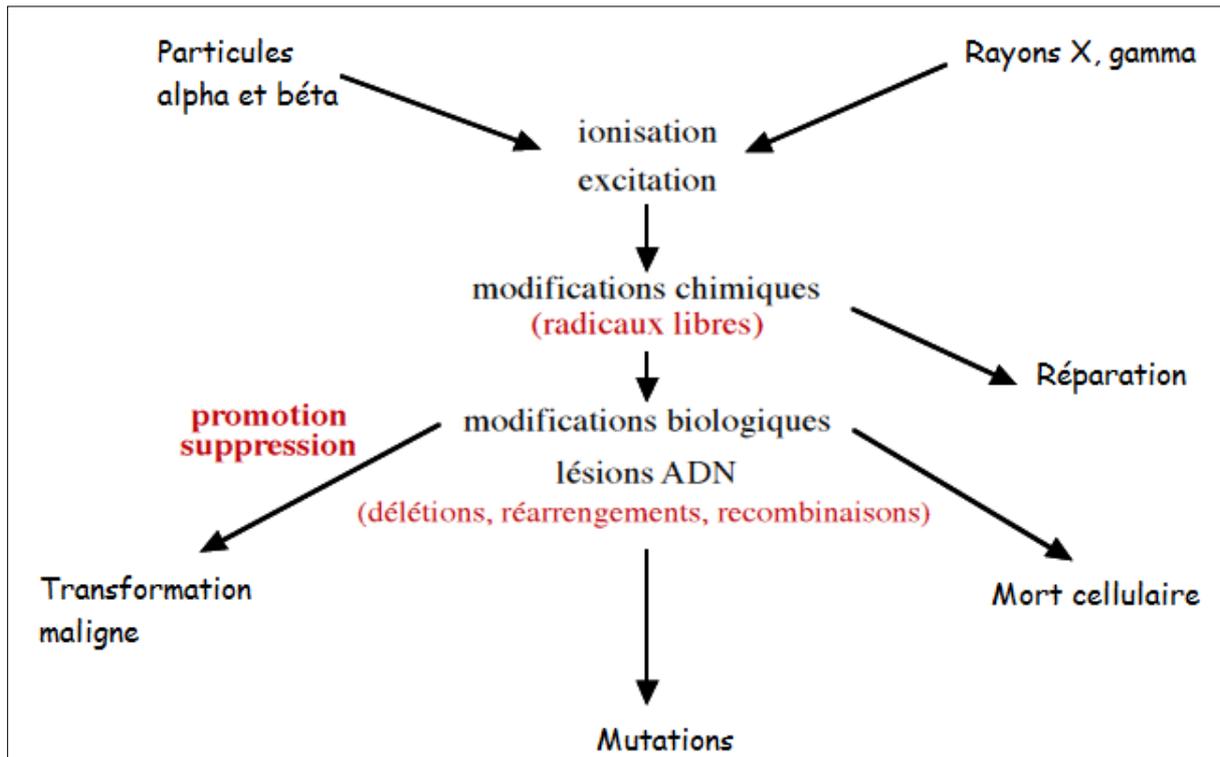


Figure 11: Physiopathologie de la cytotoxicité des radiations ionisantes, [Little et al, 2002]

I-5-4- Traitement de l'ostéoporose

a- Le traitement hormonal substitutif de la ménopause (THS)

Il réduit l'incidence des fractures vertébrales et non vertébrales (- 30 % dans l'étude WHI) pendant le temps où il est administré. Il est à noter que le THS a d'autres actions bénéfiques: amélioration des bouffées de chaleur et action trophique cutanéomuqueuse entre autres. En revanche, il majore le risque thromboembolique et augmente le risque de cancer du sein. Cet effet négatif sur le cancer du sein dépend de la voie d'administration et des produits administrés. L'effet bénéfique suspecté sur la prévention du risque cardio-vasculaire n'a pas été retrouvé dans l'étude américaine WHI mais il s'agissait d'hormones équine et de femmes âgées ayant de nombreux facteurs de risque vasculaire. Les contre-indications absolues sont les antécédents de cancer du sein, les antécédents thromboemboliques et les néoplasies de l'endomètre. L'absence d'études contrôlées conséquentes fait que le THS ne doit pas être isolément prescrit dans l'ostéoporose fracturaire. Le THS est particulièrement adapté au traitement préventif de l'ostéoporose en post ménopause selon une durée limitée de 5 à 7 ans.

Specific Estradiol Receptor Modulator (SERMs)

Ils peuvent représenter une alternative au THS (traitement hormonal substitutif de la ménopause). Le Raloxifène a été développée pour conserver les actions bénéfiques des oestrogènes sur l'os, sur le métabolisme lipidique et écarter les effets néfastes sur le tissu mammaire et les récepteurs utérins. Le Raloxifène réduit de 30 % le risque de tassement vertébral sans avoir d'action sur les fractures périphériques. Il diminue de 50 % l'incidence du cancer du sein.

b- Bisphosphonates

Il existe plusieurs essais randomisés et contrôlés [Adachi *et al*, 1997] démontrant l'efficacité de l'alendronate (Fosamax) et le risédronate (Actonel) dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose cortisonique. Une augmentation significative de la DMO (le plus souvent constatée au rachis lombaire) et une réduction de l'incidence des fractures vertébrales sont constatées dans les groupes traités par les bisphosphonates comparativement aux groupes contrôles. Les effets secondaires sont minimes touchant essentiellement le tractus gastro-intestinal haut. L'alendronate et le risédronate sont recommandés pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose cortisonique. L'alendronate est utilisé à la dose de 70 mg/semaine et le risédronate à 35 mg/semaine. Ils doivent être utilisés avec le calcium et la vitamine D. Quant aux autres bisphosphonates telque le pamidronate (Arédia) des études ouvertes ont montré un effet densitométrique positif [Boutsen *et al*, 2001]. Le zolédronate (Zométa) a aussi démontré l'efficacité d'une seule perfusion avant le début d'une corticothérapie au long cours.

c- Parathormone (PTH) 1-34 ou Tériparatide Administrée par injection sous-cutanée

La PTH stimule plus la formation que la résorption osseuse. Elle a de plus une action bénéfique sur l'architecture osseuse. Le gain densitométrique est important, de l'ordre de 10 % par an au rachis. La PTH prévient les fractures vertébrales et périphériques. L'efficacité est peut-être supérieure à celle des autres molécules mais les critères d'inclusion des patients concernés par l'étude princeps ayant validé l'efficacité de la PTH étaient différents (ostéoporose plus sévère). Les effets secondaires sont des céphalées, des nausées, des hypotensions orthostatiques. Une hypercalcémie asymptomatique transitoire survient dans

20% des cas dans les heures qui suivent l'injection. Les contre-indications sont : maladie de Paget, antécédents de radiothérapie, hypercalcémie.

d- Ranélate de Strontium

Il est commercialisé sous le nom de Protélos: Cette molécule est originale par son mode d'action : elle stimule la formation osseuse et freine la résorption. Il réduit de 41 % l'incidence des fractures vertébrales et de 36 % l'incidence des fractures du col chez des malades de plus de 74 ans. Les effets secondaires sont rares et bénins (diarrhée). L'augmentation du nombre de phlébites par rapport au groupe placebo (nombre faible dans l'absolu) doit le faire contre indiquer en cas d'antécédents thrombo emboliques graves.

e- Calcitonines

Que ce soit en injections sous cutanées ou en inhalations nasales, la calcitonine n'a pas montré d'effet préventif de la perte osseuse cortisonique ou sur l'incidence des fractures vertébrales. Cependant elle entraîne une augmentation de la DMO au rachis mais non au col fémoral chez les patients recevant une corticothérapie au long cours [Kotaniemi *et al*, 1996]. Sa seule indication reste donc l'alternative aux bisphosphonates en cas de contre-indication d'intolérance ou de refus chez les patients recevant une corticothérapie au long cours mais elle ne peut être recommandée en traitement préventif chez les patients commençant une corticothérapie.

II-Biomatériaux

II-1- Définition

Un biomatériau a été défini, selon la Société européenne des Biomateriaux, comme « matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle » (Conférences de Chester (Royaume-Uni), 1986 et 1991). Il peut ainsi être considéré comme tout matériau utilisé pour remplacer une partie ou une fonction du corps de manière sûre et fiable, acceptable d'un point de vue économique et physiologique [Park *et al*, 2007]

II-2- Classification des matériaux

Il ya quatre grand classes de biomatériaux (Figure 12)

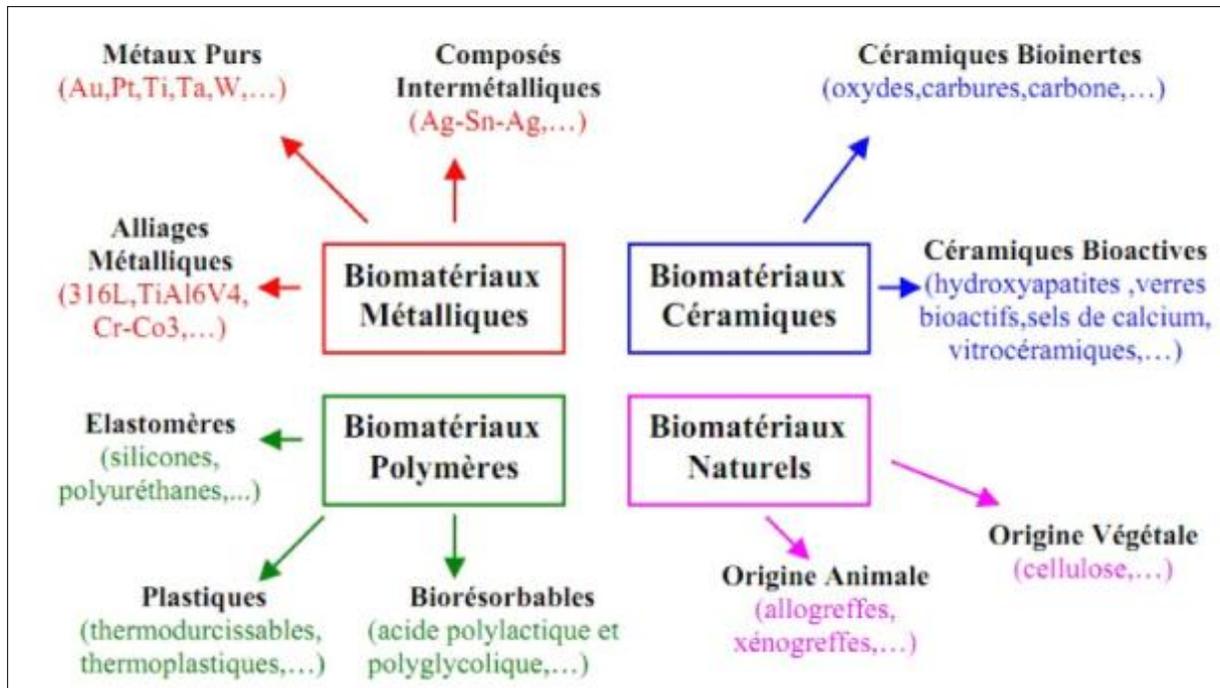


Figure 12: Classification des biomatériaux

II- 2- 1- Biomatériaux d'origine naturelle

Le souci de biocompatibilité des implants a orienté les chercheurs vers des matériaux logiquement biocompatibles puisque d'origine naturelle.

Outre les tissus biologiques retraités (valves porcines, carotide de boeuf, veine ombilicale, ...), le sulfate de chondroïtine et l'acide hyaluronique, on trouve parmi ceux-ci :

Les greffes en général (autogreffes, allogreffes, hétérogreffes) ;

La chitine, polysaccharide extrait des coquilles de crabe, qui est susceptible d'application pour les fils de suture, la chirurgie reconstructive et la peau artificielle ;

Les fucanes, polysaccharides extraits des algues marines (anticoagulants - anticomplémentaires, etc...) [Ezzahra *et al*, 2013];

Les dextrans et autres polysaccharides fonctionnalisés (le dextrane est préparé par transformation de saccharose par des bactéries) ;

La cellulose, traditionnellement utilisée pour les membranes de dialyse, ils sont à l'étude dans d'autres applications, notamment comme ciment de prothèse de hanche [Naili *et al*, 2007];

Plusieurs variétés de coraux, peuvent être utilisées pour ce type d'applications grâce à leur porosité naturelle (46 à 48 % du volume total pour les coraux de porites et de favites [Oudadesse, 1989]). Ils servent de support pour la recolonisation du tissu osseux [Guillemin *et al*, 1989]. Dès les années 1970, l'utilisation du corail en tant que biomatériau a été étudiée et les premiers tests *in-vivo* chez l'homme ont eu lieu en 1981 [Chatainier, 2007]. Les greffons coralliens ont été utilisés dans de nombreuses chirurgies (ORL, maxillo-faciale, orthopédique, comblement d'alvéoles). Les travaux de H. Oudadesse [1989] ont montré que le carbonate de calcium implanté est dissout et est remplacé par une couche d'apatite carbonatée qui se lie à l'os environnant. Les ions calcium libérés pourraient être utilisables par les ostéoblastes pour conduire à un os nouvellement formé [Legeros *et al*, 2008].

Le collagène, d'origine animale (extrait de la peau) ou humaine (extrait du placenta humain) et dont les applications existantes ou envisageables sont très nombreuses :

- Cosmétologie et chirurgie esthétique,
- Pansements et éponges hémostatiques,
- Implants oculaires et pansements ophtalmologiques,
- Reconstitution de tissus mous et durs à l'aide de mélanges collagène-facteurs de croissance-hydroxyapatite,
- Peau artificielle (derme).

II-2-2- Les biomatériaux métalliques

Découvert pour la première fois en 1790 par Gregor, qui lui donna le nom de ménachanite, le titane fut ainsi nommé en 1799 par Klaporth. Ce nouveau métal apparaît très difficile à isoler de ses composés. Hunter, chercheur Américain a obtenu les premières quantités de titane presque pur en 1910, par réduction du tétrachlorure de titane par le sodium. Il faudra attendre 1940 pour qu'un chimiste luxembourgeois, Kroll, mette au point un procédé de production industrielle. Le titane employé en odontologie est soit « pur » soit « allié ». Le titane dit « pur » ou « non-allié », ou plus exactement titane commercialement pur (Ti-cp), présente sur le plan chimique des éléments incorporés tels que l'oxygène, le fer, le carbone, l'azote et l'hydrogène. D'autres éléments tels que l'aluminium, le vanadium, le palladium, le nickel ou même le cuivre peuvent être ajoutés au titane, en quantité plus importante, réalisant ainsi un alliage de titane dont les propriétés sont optimisées en fonction de l'application désirée (aéronautique, aérospatiale, armement, implantologie ...)

Le titane peut exister sous deux formes qui se différencient par la nature du réseau cristallin : le titane peut cristalliser dans :

1. le système hexagonal compact : c'est la forme la plus stable à température ambiante, dite α .
2. le système cubique centré, non compact : c'est la forme la plus stable pour des températures supérieures à 882°C, jusqu'au point de fusion.

La résistance à la corrosion du titane est élevée, elle est favorisée par la présence d'une couche superficielle d'oxyde qui passive le métal (TiO_2). Cet état de fait assure, paradoxalement, la résistance à l'attaque par les milieux biologiques environnants. Le titane est l'un des métaux les plus inertes en milieu biologique, avec l'or et le platine, c'est-à-dire qu'il résiste totalement aux fluides corporels. Il n'a aucune toxicité. Cela est dû à sa couche d'oxyde ou film de passivation. De plus, il possède une haute résistance mécanique et un module d'élasticité très bas, ce qui le rend compatible avec les structures osseuses.

II-2-3-Les biomatériaux à base de polymères de synthèse

Les utilisations des polymères dans le domaine des biomatériaux sont extrêmement nombreuses. Les deux grandes tendances de l'usage des polymères concernent : les polymères fonctionnels qui sont susceptibles d'avoir une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant, à savoir par exemple la capacité d'interaction avec les tissus osseux. Les polymères résorbables tels que les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique qui sont utilisables en chirurgie orthopédique traumatologique [Griffith *et al*, 2000]. A cause de leur module d'Young très faible, les polymères ne sont pas très utilisés comme matériaux soumis à des charges mécaniques.

II-2-4-Les biomatériaux céramiques : Biocéramiques

Phosphate de calcium

Se sont des solides blanchâtres, ils composent la partie minérale de l'os et des dents.

Hydroxyapatite (HA)

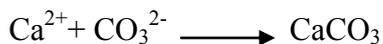
Les hydroxyapatites synthétiques, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, sont ostéophiles, ostéoconducteurs, non résorbables et biocompatibles. Il existe des hydroxyapatites poreuses ou denses

Phosphate tricalcique β (β -TCP)

Le β -TCP, de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, est nettement plus soluble que l'hydroxyapatite. La dissolution rapide du β -TCP participe à l'augmentation locale des concentrations en ions calcium et phosphate. Le taux élevé de ces ions induit une précipitation du calcium et du phosphate sous la forme d'apatite biologique, qui favorise la minéralisation de la matrice extracellulaire.

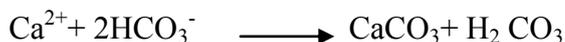
Le carbonate de calcium CaCO_3

Le carbonate de calcium (CaCO_3) est composé d'un ion carbonate (CO_3^{2-}) et d'un ion calcium (Ca^{2+}). Cette substance blanche a une masse molaire de 100,1 g/mol. Le carbonate de calcium est le composé majeur des calcaires comme la craie, mais également du marbre. C'est aussi le constituant principal des coquilles d'animaux marins, du corail et des escargots.



Le carbonate de calcium cristallise naturellement avec deux formes cristallines principales : l'aragonite et la calcite. Les deux autres formes cristallines sont plus rares : la vatérite est un hexahydrate, forme intermédiaire peu stable qui évolue vers la calcite. Il peut se présenter, dans les processus de cristallisation, sous forme de colloïde contenant de fins cristaux avec des formes plus stables.

L'ion bicarbonate (appelé également hydrogénocarbonate) est à la base de la formation du carbonate de calcium (CaCO_3) qui est faiblement soluble dans l'eau et est le constituant principal du calcaire



Les géopolymères

Les géopolymères sont des matériaux liants constitués d'un réseau tridimensionnel amorphe et sont qualifiables de polymères minéraux. Ils peuvent être élaborés à température ambiante par activation alcaline d'aluminosilicates ou en milieu acide comme les géopolymères de type phosphate ou encore silico-phosphate.

Phosphates de calcium biphasés (BCP)

Les BCP sont des céramiques composées d'un mélange, dans des proportions variables d'HA et de β -TCP. Les propriétés de solubilité et de résorption sont intermédiaires entre l'HA et le β -TCP. Le rapport HA/ β -TCP permet d'adapter le phénomène de résorption-substitution de l'implant à la cinétique du remodelage local [Bouler *et al*, 2000].

Verres bioactifs

Ils sont composés principalement d'oxydes de silicium (SiO_2), de sodium (Na_2O), de calcium (CaO) et de phosphore (P_2O_5). Les verres bioactifs trouvent actuellement des débouchés dans les domaines orthopédiques, dentaires, crâniens et dans la chirurgie du rachis. Le verre 45S5 a été mis au point par L.L.Hench noté Bioglass (composé en % massique de 45% de SiO_2 , 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO et 6% de P_2O_5). Ce verre bioactif est classé sur toute la gamme des matériaux bioactifs dans la classe A, qui correspond à l'indice de bioactivité le plus élevé. Cette bioactivité est due à la capacité du verre bioactif lorsqu'il est immergé dans le milieu physiologique de former de l'hydroxyapatite carbonatée (HAC). Cette couche d'HA permet un accrochage chimique de l'implant à l'os en environ 12 heures. La bioactivité du verre bioactif 45S5 lui confère des propriétés d'ostéoconduction, d'ostéostimulation et de résorption.

Bioactivité

Elle est définie comme étant la propriété de créer des liens chimiques étroits à l'interface matériau / tissu vivant, la bioactivité est liée à la modification de la surface de l'implant suite aux fibres de collagène synthétisés à l'interface par les ostéoblastes avec la formation de l'hydroxyapatite carbonatée suite à des réactions d'échanges avec l'environnement physiologique [Santos *et al*, 2002]. La bioactivité dépend directement des propriétés physico-chimiques du matériau et elle s'oppose à la bioinertie (matériaux biocompatible mais inerte). Dans le cas d'implants bioactifs, l'attache interfaciale est assurée par un ensemble de réactions physico chimiques au niveau de l'interface implant / tissu hôte. Ce type d'attache est appelé « fixation bioactive ».

Un matériau bioactif crée un environnement compatible à la croissance de l'os (ostéogenèse) avec le développement d'une liaison à l'interface implant / tissus hôtes : celle-ci joue le rôle d'un lien naturel à caractère extrêmement fort entre les matériaux vivants et non vivants [Hench *et al*, 1974]. A ce titre, le contrôle des cinétiques des réactions ayant lieu à l'interface implant / tissu receveur, ainsi que le contrôle du taux de relargage des espèces ioniques issues

de la dissolution du matériau, tout particulièrement les espèces silicium et calcium sont deux paramètres capitaux dans la maîtrise et l'optimisation de la bioactivité [Saravanapavan *et al*, 2003]. Le concept de la bioactivité a été étendu pour inclure une nouvelle génération de biomatériaux : les verres bioactifs.

Etapes de la bioactivité

La bioactivité se résume dans 5 étapes : [Cao *et al*, 1996]

Première étape : Les ions (Na^+ , Ca^{2+} ...) présents à la surface du verre sont échangés rapidement avec les ions H^+ ou H_3O^+ issus de la solution du fluide biologique selon l'équation suivante :



Deuxième étape : rupture des liaisons Si-O-Si du réseau vitreux par hydrolyse. Il s'ensuit une formation des groupements silanols Si-OH à l'interface et un relargage de groupements $\text{Si}(\text{OH})_4$ dans le milieu.



Troisième étape : condensation et repolymérisation d'une couche riche en silice SiO_2 sur la surface du verre :



Quatrième étape : migration des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} issus du matériau à travers la couche de gel vitreux riche en SiO_2 jusqu'à la surface du verre. À ceux-ci s'ajoutent les ions calcium et phosphates déjà présents dans le milieu biologique, le tout alimentant le développement d'une couche de phosphate de calcium en surface du matériau.

Cinquième étape : cette couche amorphe de phosphate de calcium cristallise en incorporant des anions hydroxyles OH^- et carbonates CO_3^{2-} issus du milieu et se transforme en une couche mixte d'hydroxyapatite carbonatée analogue à celle présente dans l'os.

II-3- Caractéristiques des matériaux

II-3-1- Caractéristiques physico-chimiques des matériaux

➤ **Bioinerte**

C'est un biomatériau non toxique et inactif biologiquement. Il induit la formation d'un tissu fibreux d'épaisseur variable

➤ **Porosité**

La morphologie des substituts osseux est un paramètre majeur qui conditionne leur efficacité. Il est nécessaire que le matériau contienne des pores ouverts interconnectés. Il a été montré que deux gammes de porosités doivent être présentes pour assurer une bonne reconstruction osseuse :

a- Une macroporosité

La macroporosité correspond en général à des pores de diamètre supérieur à 100 μm , et classiquement compris entre 300 et 600 μm . La présence de ces macrospores assure l'envahissement du matériau par les cellules ainsi que la mise en place de la vascularisation permettant un apport des fluides biologiques nécessaires à la survie et à la différenciation cellulaire. Une porosité minimale de 40-70 μm est indispensable pour l'envahissement de vaisseaux et la formation d'os Klenke et al [Klenke *et al*, 2008] ont montré que la taille des macrospores était directement corrélée à la quantité d'os et au nombre de vaisseaux formés après implantation de céramiques de phosphates de calcium biphasés (BCP) sur des crânes de rats. Les valeurs obtenues sont significativement plus importantes pour des gammes de porosités supérieures à 140 μm et augmentent avec la taille des pores.

b- Une microporosité

La présence de mésopores de diamètre inférieur à 10 μm communément appelées micropores dans le domaine des biomatériaux et joue par ailleurs un rôle important dans l'efficacité de reconstruction de ces matériaux. Il a été évoqué que ces micropores étaient susceptibles de jouer un rôle à plusieurs niveaux : augmentation de la surface spécifique des matériaux, création d'un microenvironnement à l'intérieur de ces pores, augmentation de la rugosité, augmentation de la résorbabilité. Ces différents paramètres, associés à la réactivité du matériau, pourraient donc avoir une influence sur la bioactivité du matériau ou ses capacités d'adsorption [Habibovic *et al*, 2008].

La porosité des matériaux est contrôlée par leur mode de synthèse. Les porosités peuvent aussi être obtenues simplement par le frittage de billes calibrées ou encore par dissolution de l'agent porogène ajouté (pour la préparation de polymères poreux par exemple).

Dans le cas des céramiques phosphocalciques, la microporosité est aussi corrélée à la température de frittage : plus la température de frittage est faible, plus la microporosité sera importante [Wilson *et al*, 2006].

Résorbabilité

Un biomatériau résorbable, une fois implanté, se dégrade suite aux activités enzymatiques, cellulaires ou encore bactériennes. Son élimination s'effectue au profit d'un remplacement par les tissus osseux. Les produits de dégradation du matériau, seront soit évacués par voie rénale, soit métabolisés et ils ne présentent aucune toxicité. De même il est nécessaire que la cinétique de résorption de ces matériaux soit proche de la cinétique d'ossification.

Biocompatibilité

On dit qu'un matériau est biocompatible lorsque celui-ci est bien toléré par l'organisme vivant et qui ne provoque pas de réaction de rejet, de réaction toxique, de lésion ou d'effet nocif sur les fonctions biologiques de ce dernier. La biocompatibilité d'un matériau peut être, dans un premier temps, mise en évidence par un test de cytotoxicité comme défini dans la norme ISO10993-5. Ces méthodes spécifient l'incubation de cellules en culture soit directement, soit par diffusion avec des extraits du dispositif, et/ou en contact direct avec le dispositif.

II-3-2- Caractéristiques biologiques des matériaux

Ostéointégration

C'est un phénomène facilité par le biais des pores présents dans le bioimplant, en effet, ils assurent l'intégration des cellules osseuses

Ostéoinduction

C'est la capacité qu'a le matériau à promouvoir l'ostéogénèse au sein d'un tissu non osseux en induisant la conversion de cellules mésenchymateuses en cellules ostéogéniques [Miyamoto *et al*, 1993].

Ostéoconduction

L'ostéoconduction est définie actuellement comme la capacité d'un matériau à permettre une croissance osseuse lorsqu'il est au contact ou à proximité d'un os [Jarcho 1981]. Le matériau doit être en mesure d'accueillir les précurseurs ostéoblastiques qui migrent de la moelle osseuse et d'assurer leur prolifération puis leur différenciation en ostéoblastes. D'un point de vue pratique, l'ostéoconduction est mesurée après implantation d'un matériau dans un site osseux. Il s'agit, en général, d'études comparatives qui mettent en évidence le potentiel ostéoconducteur d'un matériau par rapport à un autre. Les évaluations effectuées peuvent être histologiques avec la mesure de la formation d'os formé et de la vascularisation ou mécaniques avec des mesures de la force de la liaison os-matériau [Nakamura *et al*, 2008]. La composition chimique et la topographie de surface des échantillons ont une forte influence sur l'ostéoconduction. Le contact os-implant et la résistance aux tests mécaniques d'implants en titane apparaissent en effet significativement accrues en présence d'un revêtement d'HA bioactif à leur surface ou d'une rugosité importante susceptible de stimuler la différenciation et la minéralisation des ostéoblastes [Goldberg *et al*, 1995, Moroni *et al*, 2008]. En outre, bien qu'elle n'apparaisse pas indispensable dans l'initiation du phénomène la présence d'une macroporosité favorise l'ostéointégration des matériaux [Takemoto *et al*, 2005]. Les céramiques phosphocalciques présentent de très bonnes propriétés ostéoconductrices et sa capacité est déterminée par ses caractéristiques et notamment sa composition chimique et sa microporosité. L'implantation dans des fémurs de chien de céramiques de BCP (HA/ β -TCP : 62/38) montre une ostéointégration plus précoce et une quantité d'os néoformé supérieure à tous les temps de l'étude par rapport à des échantillons d'HA (de porosité similaire) [Yuan *et al*, 2006a]. Wilson *et al* ont par ailleurs, étudié de manière combinée les effets de la composition et de la microporosité sur le potentiel ostéoconducteur des céramiques phosphocalciques. Ils ont comparé la formation d'os après implantation dans le rachis lombaire de chèvres d'échantillons de β -TCP, d'HA et BCP qui ont été frittés à des températures variables, et donc qui présentent des microporosités différentes. Ils ont ensuite classé les échantillons par rapport à leur potentiel ostéoconducteur : BCP frittées à faible et moyenne température (rugueuses et lisses) = β -TCP > HA frittée à faible température > BCP frittée à haute température (rugueuses et lisses) > HA frittée à haute température. Au vue des résultats obtenus, ils indiquent que le paramètre qui déterminerait le potentiel ostéoconducteur serait la bioactivité des céramiques liée à leur vitesse de dissolution [Wilson *et al* 2006]. Dans une de son étude, Habibovic *et al*, ont obtenus des résultats comparables après implantation en site orthotopique de différents phosphates de calcium : L'HA, l'apatite carbonatée et des céramiques de BCP dépourvues de micropores induisent peu de formation

osseuse alors que celle-ci est très importante pour des échantillons de BCP microporeux [Habibovic *et al*, 2008].

Eléments présentant un intérêt pour les biomatériaux (Mg, Sr, Ti et Zn)

➤ Magnésium

Le magnésium est un élément essentiel au métabolisme du corps humain. Il est naturellement présent dans la matrice osseuse, il est présents à l'état mineurs, majoritairement présent [Oudadesse *et al*, 2009], et essentiellement dans les cristaux d'hydroxyapatite $\text{Ca}_{3-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_2$ [Oudadesse *et al*, 2009]. Il joue un rôle important au cours de la croissance de l'organisme et il est administré au corps par l'alimentation. Plusieurs enzymes sont dépendantes du magnésium (constitution et activation). Ce dernier permet la stabilisation de la structure de l'ADN et de l'ARN [Okuma *et al*, 2001]. De plus, grâce à ses rôles fonctionnels et sa présence dans le tissu osseux, le magnésium permet de stimuler la croissance des tissus osseux [Yamasaki *et al*, 2003].

➤ Zinc

Le zinc est l'un des éléments traces les plus importants de l'organisme. Il est présent dans les organes, les muscles ou encore le squelette [Molleson *et al*, 1988]. La teneur en zinc dans les tissus osseux est de 117 $\mu\text{g/g}$ [Oudadesse *et al*, 2009]. Cet élément est connu pour son rôle dans de nombreuses fonctions biologiques, comme les réactions enzymatiques (il participe à plus de 300 enzymes), la synthèse de protéines ou encore l'activité hormonale [Ito *et al*, 2002]. Il joue aussi un rôle important dans la régulation de la balance oxydatif. L'introduction du zinc dans la matrice vitreuse de biomatériau améliore la prolifération des ostéoblastes ainsi que la repousse osseuse sur le site d'implantation, en permettant une meilleure cicatrisation [Yamaguchi *et al*, 1986]. Dans les verres de phosphate, sa présence permet d'augmenter la stabilité chimique des verres en milieu aqueux [Ennas *et al*, 1990]. Enfin, des études ont montré que la présence de zinc pourrait avoir une influence sur la morphologie et la cristallisation de cristaux d'apatite biologiques [Kokubo *et al*, 1993].

➤ Strontium

Présente des propriétés chimiques très proches de celles du calcium, il joue un rôle important au niveau de la matrice osseuse et 98% du strontium total de l'organisme est stocké dans les tissus osseux (140 $\mu\text{g/g}$) [Oudadesse *et al*, 2012]. Egalement il est connu pour son

rôle dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose, grâce à sa capacité à stimuler la repousse osseuse et à prévenir la résorption de l'os [Takahashi *et al*, 2003]. Il est alors utilisé sous la forme de sel divalent, le ranelate de strontium, et introduit à faible dose (légèrement supérieure à sa concentration physiologique) [Meunier *et al*, 2004]. En effet l'introduction de strontium dans la matrice vitreuse du bioimplant inhibe l'effet de l'ostéoporose [Jebahi *et al*, 2013]. Les apatites enrichies en strontium sont alors plus stables, ce qui défavorise la résorption de l'os [Boivin *et al*, 1996].

➤ **Titane**

C'est un élément de transition à basse densité et à point de fusion élevé. Il possède un ensemble unique de propriétés mécaniques et de résistance à la corrosion qui le rend particulièrement approprié pour des applications très contraignantes, notamment dans la chimie et l'industrie aérospatiale. Ces propriétés sont également à l'origine de son utilisation en chirurgie.

Il y a plusieurs qualités de titane commercialement pur, contenant des quantités variables d'oxygène dissous et de fer ; la résistance est d'autant meilleure que la teneur en oxygène est élevée.

Bisphosphonates

Les bisphosphonates (BPs) sont connus par des chimistes depuis le milieu du 19^{ème} siècle, la première synthèse a été effectuée par le russe Menshutkin en 1865. Mais ce n'est qu'à partir des années 1950 que la propriété principale de ces composés fut vraiment exploitée par l'industrie.

Les BPs possèdent une forte capacité à complexer les métaux, ils ont la propriété de se lier avec des ions métalliques tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{2+} par coordination d'un atome d'oxygène de chaque groupe phosphonate avec le cation. De nombreux composés, comme l'étidronate (ou EHBP), furent développés afin d'être utilisés comme agent détartrant, anticorrosif, agent complexant dans le textile, fertilisant ou encore comme adoucisseurs d'eau. Les BPs sont des analogues stables des pyrophosphates, pour lesquels la liaison P-O-P est remplacée par une liaison P-C-P capable de résister à une hydrolyse enzymatique, tout en conservant les mêmes propriétés vis à vis des cristaux d'apatite (Figure 13).

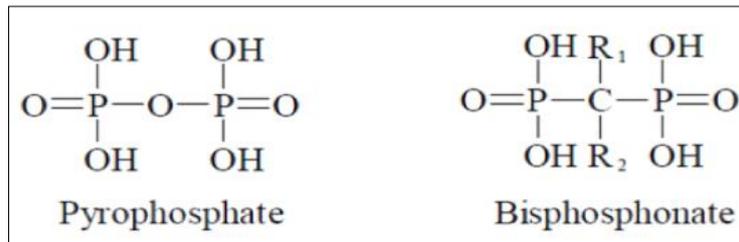


Figure 13: Formules chimiques des pyrophosphates et des bisphosphonates

Caractéristiques biologique des bisphosphonates

Les BP furent tout d'abord étudiés pour le traitement de pathologies associées au métabolisme osseux, du fait de leur forte affinité pour l'os. Il fut rapidement démontré que ces composés possédaient de fortes propriétés antirésorptives. En effet, les BP interfèrent avec le recrutement et la différenciation des ostéoclastes; ils inhibent la résorption osseuse via l'inhibition de l'activité ostéoclastique [Vitte *et al*, 1996]. « *In vitro* » et chez la souris, ils induisent l'apoptose des ostéoclastes (étidronate, clodronate, pamidronate). Ils inhibent aussi l'adhésion des cellules prostatiques tumorales à la matrice extracellulaire de l'os minéralisé et non minéralisé [Boissier *et al*, 2000]. Un certain nombre de BP sont déjà utilisés cliniquement pour le traitement de : l'ostéoporose, la maladie de Paget l'hypercalcémie.

Le groupement R1 de la chaîne latérale : C'est le plus souvent une fonction hydroxyle, cette dernière permet d'augmenter l'affinité pour l'os, mais n'a pas d'incidence sur la résorption osseuse.

La nature de la chaîne R2 : Conditionne grandement les propriétés biologiques des bisphosphonates, en particulier leur capacité à inhiber la résorption osseuse. Les BP de seconde et de troisième génération possèdent un groupement azoté, sous forme d'amine ou intégrés dans un hétérocycle, ce qui leur confère un pouvoir antirésorptif supérieur aux BP de première génération (Figure 14).

1 ^{ère} génération		2 ^{ème} génération		
Etidronate Didronel® Procter & Gamble	Clodronate Clastoban®	Pamidronate Arédia® Novartis	Alendronate Fosamax® Merck	Tiludronate Skelid® Sanofi-Synthelabo
3 ^{ème} génération				
Ibandronate Bondronat®	Risedronate Actonel® Procter & Gamble	Zoledronate Zometa® Novartis		

Figure 14: Formules de quelques BPS utilisées comme médicaments.

*Il dégrade les ostéoclastes par apoptose (BPs de la première génération)

*Action anti-parasitaire des bisphosphonates : Les BPs ont été récemment identifiés comme des agents potentiellement anti-parasitaires. Ils ont, par exemple, une action sur le parasite de la toxoplasmose, maladie assez répandue et dont les conséquences peuvent être désastreuses en particulier chez les femmes enceintes ou les individus immunodéficients.

***Action indirect sur les métastases osseuses** : Les métastases osseuses sont des complications fréquentes de nombreux cancers dont les cancers du sein et de la prostate. Il existe essentiellement deux types de métastases osseuses sur le plan clinique :

Métastases ostéolytiques

Elles entraînent une résorption osseuse accrue dans l'environnement proche des cellules métastatiques. Cette hyperrésorption osseuse est consécutive à une stimulation par les cellules métastatiques de l'activité des ostéoclastes.

Métastases ostéocondensantes

Elles sont consécutives à une stimulation par les cellules métastatiques de l'activité des ostéoblastes, ce qui entraîne une formation excessive d'os de structure anarchique.

Cette phase d'ostéocondensation est précédée d'une phase active de résorption osseuse. Par conséquent les BPs par leurs propriétés antirésorptives, s'avèrent très efficaces dans le traitement des complications liées aux métastases osseuses.

Durant les 20 dernières années, de nombreuses études *in vivo* ont démontré l'action de certains BPs sur les métastases osseuses : Etidronate, Clodronate, Pamidronate, Alendronate, Icandronate, Risedronate, Ibandronate, Minodronate et Zolédronate.

* **Action antiangiogénique** : De plus, les BPs sont décrits comme ayant un effet anti-angiogénique. L'angiogénèse ou néovascularisation est essentielle pour la croissance des tumeurs et le développement des métastases. Elle contribue après les étapes de migration et de prolifération des cellules endothéliales, à la différenciation de ces cellules en structure de type capillaire afin de former un réseau vasculaire nécessaire au développement des tissus. Ce phénomène est régulé par de nombreux facteurs, dont le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) qui joue un rôle prédominant. Les bisphosphonates en inhibant l'activité des cellules endothéliales (inhibition de la voie du mévalonate), réduisent la sécrétion de VEGF par la cellule tumorale, facteur important de croissance vasculaire endothélial, et par conséquent inhibe la formation de ce réseau vasculaire.

***Action sur le système immunitaire** : Les BPs sont également décrits pour avoir des effets immuno-modulateur. Des études *in vitro* et *in vivo* ont tout d'abord montré que les NBPs (alendronate, ibandronate, pamidronate, risedronate et zolédronate) pouvaient stimuler la prolifération des cellules $\gamma\delta$ T143 soit directement en étant reconnu comme un antigène spécifique par le système immunitaire, soit indirectement en inhibant la FPPS ce qui entraîne une accumulation d'IPP antigène naturel non peptidique déjà décrit comme étant reconnu par le système immunitaire.

Les NBPs sembleraient également sensibiliser les cellules tumorales à la lyse par les cellules $\gamma\delta$ T141, 142, 145, les raisons de cet effet ne sont pas clairement définies.

Mode d'action des bisphosphonates

Les bisphosphonates inhibent la résorption osseuse, toutefois leur mécanisme d'action est complexe et reste mal élucidé [Fleisch *et al*, 1998]. Les bisphosphonates pourraient inhiber l'activité des ostéoclastes matures; il est possible qu'ils soient internalisés et interfèrent avec des mécanismes biochimiques spécifiques, en inhibant la pompe à protons, l'activité tyrosine-phosphatase, ou en induisant une apoptose. Le principal effet à long terme des bisphosphonates sur le remodelage osseux est une diminution de la fréquence d'activation des unités de remodelage. Il est probable qu'en plus de l'effet inhibiteur sur la fonction des ostéoclastes actifs, existe également un effet inhibiteur sur le recrutement de nouveaux ostéoclastes, suggérant une action à plusieurs étapes du remodelage osseux, et affectant probablement d'autres types cellulaires [Parfitt *et al*, 1996].

Les mécanismes d'action moléculaires des bisphosphonates font l'objet de nombreuses études, des travaux récents suggèrent une interférence des bisphosphonates aminés avec la voie de biosynthèse du cholestérol, par une inhibition de synthèse de certains dérivés du mévalonate avec pour conséquence une diminution de la prénylation de certaines protéines dont le rôle est fondamental dans la fonction des ostéoclastes matures résorbant [Russell *et al*, 1999].

Risédrionate

Est un dérivé aminé à fort pouvoir d'antirésorption de la troisième génération des bisphosphonates; il est indiqué particulièrement dans les traitements préventifs et curatifs de la perte osseuse post ménopausique précoce [Watts, 2008].

Tableau 1: Présentation des bisphosphonates en fonction de leurs rôles biologiques

Bisphosphonates	Rôles
Etidronate	Agent de chélation du calcium, Traitement de l'eau, les produits cosmétiques ou comme composé pharmacologique.
Clodronate	Inhibiteur de la résorption osseuse et agent anti-hypercalcémique
Pamidronate	Anti-ostéoporotique
Alendronate	Anti-ostéoporotique et d'autres maladies osseuses.
Tiludronate	Traitement de la maladie naviculaire et de l'éparvin
Ibandronate	Prévention et Traitement de l'ostéoporose
Risedronate	Fortifier les os, Prévention et Traitement de l'ostéoporose et Traitement de la maladie de Paget
Zoledronate	Traitement de l'ostéoporose

Méthodologies

I-Synthèse des verres bioactifs

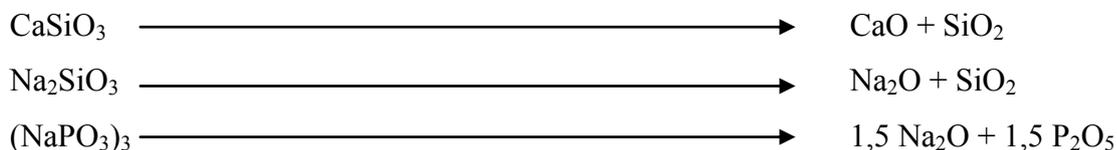
I-1-Synthèse par fusion du verre bioactif 46S6

La composition chimique du verre bioactif étudié est choisie dans un système quaternaire SiO₂, CaO, Na₂O et P₂O₅. Le verre bioactif 46S6 est composé de : 46% SiO₂, 24% CaO, 24% Na₂O et 6% P₂O₅ (% massique) [Dietrich *et al*, 2008]. La synthèse a été réalisée par la méthode de fusion à partir de silicate de calcium, de silicate de sodium et de phosphate de sodium selon les proportions massiques suivantes :

- CaSiO₃ : 49,51 %
- Na₂SiO₃ : 42,06 %
- NaPO₃ : 8,43 %

Le mélange en poudre a été placé dans un mélangeur mécanique pendant 30 minutes, afin d'obtenir un composé homogène. Ensuite, il a été chauffé dans un creuset en platine afin d'éviter toute pollution, selon un régime de chauffage bien précis.

Une première étape de calcination est réalisée à une température de 900°C par pas de 10°C. min⁻¹. Cette température est maintenue pendant une heure pour une décomposition des compositions chimiques selon les réactions suivantes :



Par la suite, la température est augmentée à 1300°C avec une rampe de 20°C. min⁻¹. Cette température est maintenue pendant 3 heures pour faire fondre le mélange réactif des quatre oxydes.

Le mélange fondu est coulé dans des moules en laiton préchauffés à 500°C afin de réduire les chocs thermiques et recuit pendant 4 heures à la température de transition vitreuse afin d'éliminer les contraintes mécaniques résiduelles. A l'issue du recuit, le verre est refroidi jusqu'à la température ambiante selon une rampe de 1°C. min⁻¹. Le verre massif est ensuite broyé et tamisé pour obtenir des particules de tailles inférieures à 40 µm.

I-2- Synthèse d'une vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane

Pour l'élaboration du biomatériau poreux, plusieurs paramètres de synthèse ont été étudiés : le taux de zinc dans le verre bioactif, le taux de TiN introduit, la température et la durée du traitement thermique ainsi que la méthode d'homogénéisation. Après de nombreux essais, la méthode de synthèse a pu être établie et le biomatériau poreux reproduit.

Le protocole de synthèse est le suivant :

1^{ère} Etape : synthèse du verre 46S6-10Zn

La synthèse du verre a été réalisée de la même manière que le 46S6 avec l'ajout de l'oxyde de Zinc (ZnO). En effet, sa composition chimique est la suivante (en pourcentage massique) : 46% SiO₂, 24% CaO, 24% Na₂O, 6% P₂O₅ et 10% ZnO. Les verres massifs obtenus ont été broyés tout d'abord à l'aide d'un mortier puis d'un broyeur mécanique. La poudre obtenue a été ensuite tamisée dans le but d'obtenir une poudre de granulométrie inférieure à 40µm.

2^{ème} Etape : Ajout du nitrure de titane

Le TiN utilisé présente une granulométrie de 3µm

Pour synthétiser le biomatériau poreux, nous avons mélangé dans un bécher le verre 46S6-10Zn préalablement broyé à 2% en masse de ce nitrure de titane.

3^{ème} Etape : Homogénéisation des poudres

Dans le bécher, un barreau aimanté et un volume suffisant de cyclohexane ont été ajoutés. Le mélange a été agité pendant une durée de 2 heures dans le but d'avoir un mélange homogène. Celui-ci est considéré comme tel lorsque le mélange est de couleur gris foncé.

4^{ème} Etape : Séchage du mélange

Une fois l'homogénéisation effectuée, le surplus de cyclohexane a été retiré à l'aide d'une pipette pasteur et le bécher a été placé dans l'étuve à 70°C pendant une heure pour éliminer la totalité de cyclohexane.

5^{ème} Etape : Traitement thermique

Une fois séché, le mélange a été introduit dans des moules en quartz de forme cylindrique de 3 cm de diamètre, résistant à plus de 1600°C et préalablement enduit d'un agent démoulant à base d'eau déminéralisée, de carbonate de calcium et de silicate de sodium. Le traitement

thermique a été effectué à 925°C pendant 30 min suivant une montée en température de 5°C min⁻¹ et une descente libre température ambiante.

I-3- Synthèse d'un matériau hybride: Verre associé au risédronate

a-Protocole expérimental

Les tests d'adsorption peuvent être réalisés soit par suivi de la diminution de la concentration de l'adsorbat dans la solution ou par dosage de la quantité fixée à la surface du solide. Toute Pour ce raison, nous avons opté pour la première méthode.

b- Adsorbant et adsorbat

L'adsorbant utilisé dans cette étude est un verre bioactif obtenue par. Il s'agit d'un amorphe.

Le bisphosphonate que nous avons utilisé est le risédronate monosodique semi penta hydraté. Ce principe actif rentre dans la composition de comprimés commercialisés sous le nom « d'Actonel ». Nous rappelons que le risédronate monosodique sera désigné par BP (bisphosphonate).

c- Phénomène d'adsorption

Les solutions utilisées comme milieu d'adsorption ont été fraîchement préparées; elles ont été obtenues en dissolvant la quantité appropriée de risédronate dans une solution standard de chlorure de potassium (KCl, 1 mM). Dans certains cas, la force ionique des solutions d'adsorption a été ajustée par addition de solutions de KCl (0-10 mM). Le pH des solutions d'adsorbats (Ph initial) a été ajusté selon le cas, par addition d'une solution de KOH (0,5-3,5 M) et/ou d'une solution de HCl (0,5-2,5 M). La démarche adoptée pour nos tests d'adsorption repose sur des expériences réalisées en conditions statiques, sous forme de tests en «batch».

Le dénominateur commun de ces tests est la mise en suspension des poudres du 46S6 (50 mg) dans des tubes en polyéthylène de contenance 10 ml, avec 5 ml de solutions d'adsorption. Les pourcentages utilisés varient entre 0 et 20%. Après agitation des suspensions aux ultrasons (2 à 3 min), les tubes ont été incubés durant 40 min dans une étuve

dont la température a été préalablement fixée à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Les suspensions ainsi obtenues ont été centrifugées durant 20 min à 15000 tr/min, puis filtrées sur millipore ($\text{Ø} : 0,2 \mu\text{m}$). Dans tous les cas, des témoins contenant seulement la solution de bisphosphonates ont été traités dans les mêmes conditions que les expériences d'adsorption, afin de tenir compte de toute éventuelle fixation d'adsorbat sur les parois des tubes utilisés.

La quantité de bisphosphonate adsorbée (Q) a été déterminée par différence entre la concentration initiale de la solution d'adsorbat (C_0) et celle obtenue à l'équilibre (C_e) selon la relation :

$$Q = (C_0 - C_e) \times \frac{V}{m}$$

Où V désigne le volume de la solution utilisé (L) et m la masse de l'adsorbant (g). La quantité adsorbée Q peut être rapportée à l'unité de masse ou de surface spécifique du support. Des tests d'adsorption ont été réalisés plusieurs fois (2 à 3 fois) afin d'estimer l'erreur sur la quantité d'adsorbat fixée à la surface du support. La reproductibilité de nos observations expérimentales a été estimée à environ 5 %

I-3- Stérilisation à l'aide des rayons gamma des biomatériaux

Les biomatériaux ont été stérilisés au rayon Gamma par ^{60}Co (Equinox, Royaume-Uni) (Figure 1)



Figure 1. Stérilisation du bioimplant avec les rayons Gamma ^{60}Co (Equinox, Royaume-Uni)

II- expérimentation *in vitro* en l'absence des cellules (immersion dans le SBF (simulated body fluids))

Deux solutions distinctes (Ca-SBF et P-SBF) ont été préparées selon ce protocole. Le mélange de deux solutions lesquelles dans des proportions identiques nous a permis d'obtenir le liquide physiologique synthétique appelé : Simulated Body Fluid (SBF). L'intérêt de synthétiser deux solutions stables, réside dans le fait qu'elles peuvent être conservées quelques semaines, alors que le SBF ne peut être conservé que quelques jours.

Pour chaque solution, en environ 990 ml d'eau distillée a été chauffée dans un bécher au bain-marie et maintenus à 37°C pendant la durée de synthèse. Les réactifs ont été rajoutés dans les proportions suivantes, sous agitation magnétiques (Tableau 1):

Tableau 1 : Compositions de Ca-SBF et P-SBF

Ca-P	Masses (g)	P-SBF	Masses (g)
Tris : C ₄ H ₁₁ NO ₃	6,0570	Tris : C ₄ H ₁₁ NO ₃	6,0570
CaCl ₂	0,5549	KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	0,4566
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,6095	NaHCO ₃	0,7056
		KCl	0,4473
		NaCl	16,10

Le pH des deux solutions a été ensuite amené à 7,4 par ajout de HCl 6N. Les solutions ont été transférées dans une fiole jaugée et le volume complété à 1L. Après utilisation, les solutions ont été stockées au réfrigérateur, à une température comprise entre 5 et 10°C.

Immersion des échantillons

Pour chaque composition de verre, 30 mg de poudre de granulométrie inférieure à 40 µm ont été immergés dans 60 ml de SBF. Chaque test a été réalisé en 4 assai pour 3 délais : 1, 15 et 30 jours. Le SBF a été prélevé et stocké à l'issue de chaque délai et la poudre a été séchée à température ambiante. Cette série d'essais a été réalisée afin de mieux comprendre les modifications structurales du réseau vitreux au cours du processus de bioactivité. Une fois séchée, les poudres ont été analysées par différentes méthodes : DRX, IR, MEB-EDS et le RAMAN et le SBF par ICP-OES.

III-Expérimentations « *in vivo* »

III-1- Etude *in vivo* chez un modèle animal ostéoporotique (rattes irradiées aux rayons gamma)

Nous avons eu recours à l'irradiation des rattes aux rayons γ afin de créer l'ostéoporose et par conséquent d'évaluer l'effet du 46S6 et du 46S6-10Zn-2Ti sur les processus d'ostéogenèse.

III-1- 1- Irradiation des rattes

Pour créer l'ostéoporose, les rattes ont été exposées à différentes doses de rayons gamma (1, 2, 4 et 15Gy). Les durées d'exposition varient en fonction de la dose d'irradiation ciblées pour chaque animal. Elles ont été immobilisées sur une table en position dorsal, les quatre membres ont été maintenus en extension à l'aide de lacettes. Ensuite les animaux ont été introduits dans l'appareil de radiothérapie et ne maintenant que les condyles fémoraux dans le champ du rayonnement. 3 semaines après irradiation, les effets biologiques de celle-ci sont apparus (création d'ostéoporose et stress oxydant), les implantations avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti ont été réalisées.

III-1-2- Implantation

A- Dispositif chirurgical pour l'implantation des biomatériaux (Figure 2)

Matériel anesthésique

Les rattes ont été anesthésiées avec un mélange xylazine / kétamine. La patte arrière droite a été rasée. Après l'injection, l'animal a été isolé et placé au calme durant 15 à 20 minutes environ. Une anesthésie locale à l'aide de la xylocaine (unicaine ,2%, UNIMED) a été toujours associée.

Matériel chirurgical pour l'opération

L'implantation a été faite au sein du laboratoire d'orthopédie et de traumatologie à la faculté de médecine de Sfax avec une équipe de chirurgiens. Dans les conditions normales de chirurgie.

B- Déroulement de l'opération

Installation des animaux pour l'opération

Chaque animal a été installé sur une planche en position dorsale, ses pattes ont été maintenues en extension à l'aide de lacets fixées à la planche.

L'opération chirurgicale

Pour la ratte, un prélèvement osseux a été réalisé au niveau de chaque condyle fémoral. Une perforation a été d'abord réalisée à l'aide d'une mèche de diamètre de 2mm, inférieure à la taille définitive de la perte osseuse. Puis un forage définitif a été effectué à l'aide d'une mèche 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 bonne coaptation du biomatériau a été vérifiée. La suture cutanée a été réalisée au fil non résorbable pour suivre l'évolution de la cicatrisation. Le pansement postopératoire a été fait avec une compresse stérile passée sur les différentes plaies opératoires après application locale de Bétadine gel.

Soins post opératoires

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. Les plaies ont été nettoyées par le sérum physiologique et par la Bétadine gel.

Observation clinique

Il s'agit d'un examen de base pour:

- *Évaluation globale de l'état général de l'animal après l'acte opératoire,
- *Suivi du comportement de l'animal envers les aliments et les boissons,
- *Évaluation de ses réactions envers le manipulateur,
- *Observation de l'animal en mouvement afin d'évaluer sa prise d'appui sur le membre opéré.
- *Pesée régulière de chaque animal ainsi qu'un examen attentif des sites opératoires

C-Sacrifice et prélèvement des échantillons

Les échantillons ont été extraits après 30 jours. Le sang a été utilisé pour les analyses biochimiques et hématologiques et l'os servira pour les analyses biologiques (histologie et stress oxydant) et physico-chimiques. En effet, des échantillons ont été conservés dans le BB'S puis inclus en résine méthacrylique pour servir à la confection des coupes histologiques des tissus osseux. D'autres seront utilisés pour évaluer la balance oxydative en même temps d'autres vont être conservés dans le formol 10% et vont servir pour les analyses physico-chimiques (Figure 2).

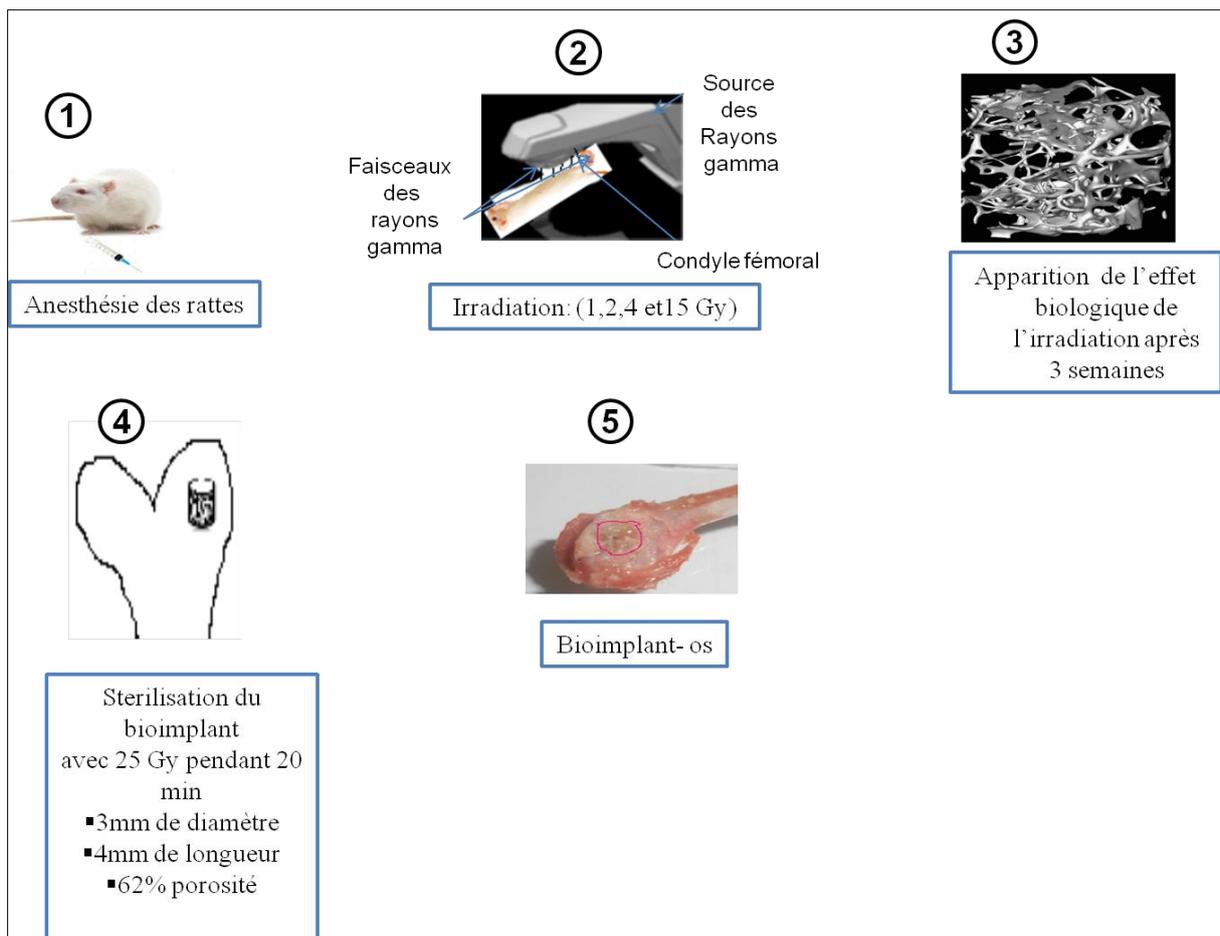


Figure 2. Protocole expérimentale de l'implantation des rattes irradiées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti

III-2- Etude *in vivo* chez un modèle animal à perte osseuse (lapins à pertes osseuses induites) (Figure 3)

On a choisi comme modèle animal expérimental le lapin mâle de race Néozélandaise, en croissance et pesant en moyenne 2 Kg.

Groupes expérimentaux : Les lapins ont été répartis en 3 groupes contenant chacun 5 lapins
Des lapins témoins.

Des lapins opérés sans implant

Des lapins opérés avec 46S6-10Zn-2Ti comme implant

Conditions de l'animalerie :

La température : ambiante varie entre 23°C et 30°C.

La lumière: Le cycle d'intensité lumineuse requis pour les animaux de laboratoire est de 12h/12h (cycle jour/nuit).

L'alimentation : Les animaux ont le libre accès à l'eau et à la nourriture qui était équilibrée de point de vue énergétique.

Le bruit : il est nécessaire de contrôler les bruits engendrés par les divers équipements (mécaniques, soufflerie, dispositifs de régulation de température et par les activités du personnel...).

La ventilation: une ventilation adéquate est absolument nécessaire, elle permet de réguler la température et l'humidité, d'assurer un bon apport d'oxygène et d'éliminer les poussières et les odeurs néfastes.

Les cages: de tailles adaptées à celles des lapins, sont adjacentes de manière à améliorer les contacts sociaux de l'animal

Protocole opératoire

Le protocole choisi était le suivant

Une préanesthésie par injection intramusculaire de la kétamine (kétamine 250mg /g PANPHARMA, France) à la dose de 1 ml puis après une heure et demi on injecte de la kétamine à la dose de 1 ml +Hypnovel à la dose de 0,1 ml en intramusculaire. 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.

L'association de l'anesthésie générale et locale a permis d'obtenir une bonne anesthésie ainsi qu'une bonne analgésie.

Déroulement de l'opération

a- 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)

b- Installation, anesthésie locale

Le lapin a été placé sur un champ qui couvre la table opératoire. Le membre pelvien droit est maintenu suspendu et fixé à une potence par son extrémité distale permettant d'exposer la cuisse et le tibia dans leur totalité avec les articulations du grasset et du jarret.

Un badigeonnage du membre a été réalisé à l'aide d'une solution Bétadine. 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.

c- L'acte chirurgical

Un mini fixateur externe a été posé au niveau du tibia du lapin afin de stabiliser l'os avant de commencer la chirurgie osseuse.

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 segment de 1 cm de la partie médio diaphysaire du tibia a été enlevé. Le biomatériau a comblé la perte de substance osseuse pour le premier groupe uniquement (figure 3C), par contre aucun comblement n'a été fait pour le deuxième groupe (figure 3B). 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.

Pansement : Le pansement postopératoire a été fait avec une compresse stérile passée entre les broches du fixateur externe et sur les différentes plaies opératoires après application locale de Bétadine gel.

Soins post opératoire : Le pansement a été changé après trois jours de l'opération. Un contrôle quotidien des plaies a permis de :

- Vérifier l'état des cicatrices et de nettoyer les plaies.
- Vérifier la stabilité du fixateur au niveau du membre opéré.

Les plaies ont été nettoyées au sérum physiologique et à la Bétadine gel.

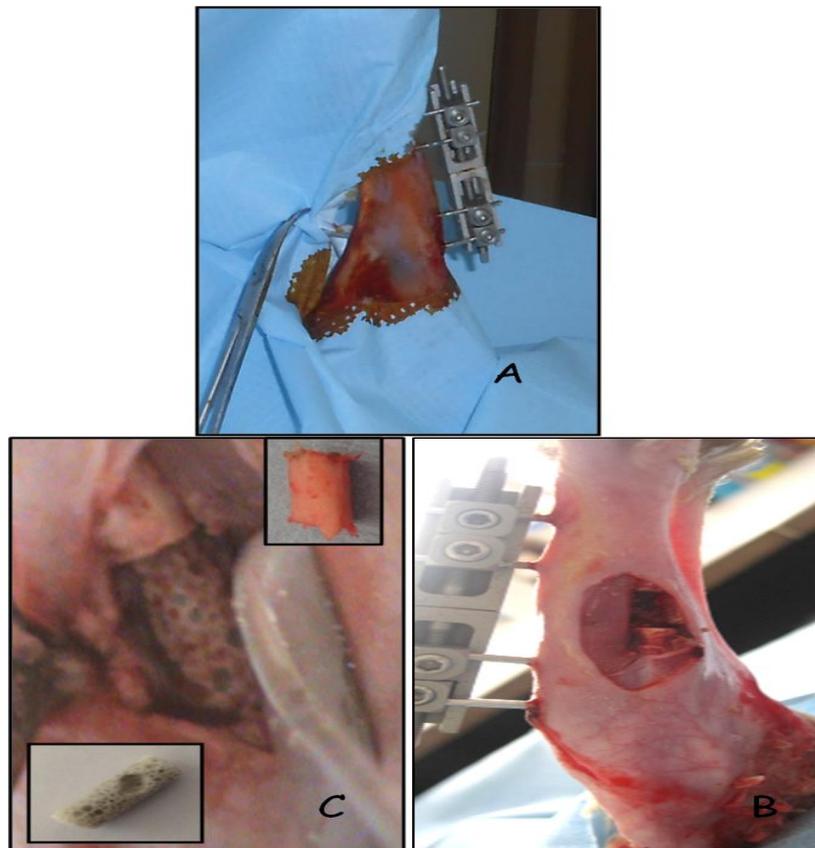


Figure 3. Position du mini-fixateur externe (A), groupe sans (B) et avec 46S6-10Zn-2Ti (C)

d- Sacrifice et prélèvement d'organe

Après différents délais d'implantation (1, 4, 6 et 9 mois) les animaux ont été sacrifiés et les échantillons 46S6-10Zn-2Ti-os ont été prélevés.

IV- Principe des techniques d'analyse biologique et physicochimique

IV-1- Analyses physico-chimiques

Les biomatériaux synthétisés avant et après immersion et implantation ont été caractérisés par diverses techniques physico-chimiques telles que la diffraction des rayons X (DRX), Spectroscopie d'absorption Infrarouge (FT-IR), Microscopie électronique à balayage (MEB), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), Spectrométrie par diffusion Raman (RMAN), Ultraviolet- visible (UV-VIS) et Spectrométrie d'émission optique : ICP-OES ;

IV-1- 1-Spectroscopie d'absorption Infrarouge (FT-IR)

Les liaisons chimiques entre atomes formant la molécule peuvent être étirées, fléchies, subir une torsion axiale ou encore vibrer latéralement. Tous ces déplacements satisfont l'approximation qui consiste à considérer la molécule comme un ensemble d'oscillateurs harmoniques. Les oscillateurs peuvent être mis en résonance par perturbation de leur état d'équilibre. La spectrométrie infrarouge est une technique qui permet d'étudier et de caractériser ce type de vibrations [Griffiths *et al*, 1986] (Figure 4).

Principe

Le matériau est soumis à un rayonnement électromagnétique dont la longueur d'onde excitatrice appartient à l'infrarouge (λ entre 2,5 et 15 μm). Lorsque la fréquence du champ électromagnétique associée au rayonnement est égale à la fréquence d'un des modes de vibration d'une molécule du matériau, il y a absorption de l'énergie : la molécule entre en vibration. Elle passe d'un niveau d'énergie fondamentale à un autre excité.

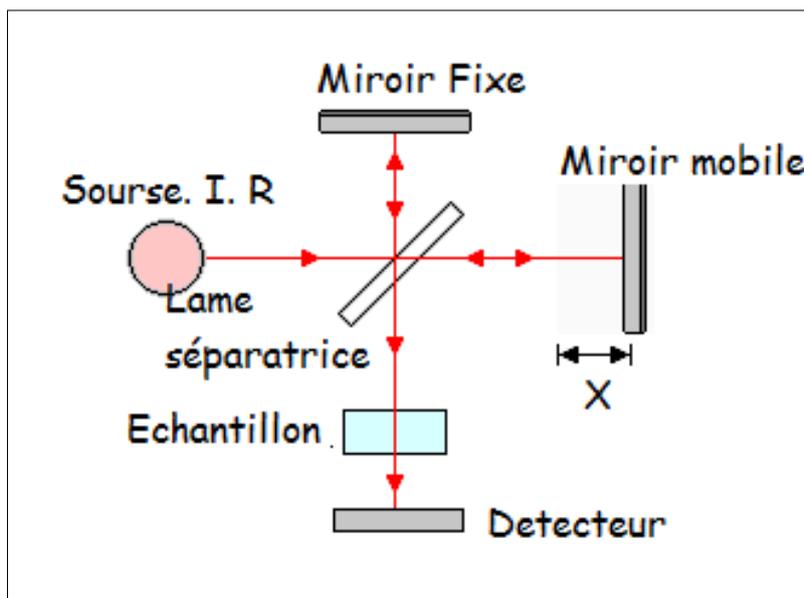


Figure 4. Principe de la spectrométrie FT-IR.

Les règles de sélection de la spectroscopie infrarouge imposent un changement dans le moment dipolaire de la molécule pour que la vibration soit active en infrarouge. Si la molécule possède un centre de symétrie, seules les vibrations antisymétriques par rapport à ce centre seront actives.

L'analyse spectrale du faisceau transmis permet d'observer les bandes d'absorption correspondant à une vibration ou à une combinaison de vibrations pour une longueur d'onde donnée. Chaque type de groupement vibre dans des domaines de longueur d'onde bien définis selon le mode de vibration.

Pour désigner les vibrations localisées on utilise les symboles suivants :

ν : Étirement d'élongation

δ : Cisaillement

γ r: Balancement

γ w: Rotation

τ : Torsion

La classification distingue les vibrations symétriques et antisymétriques par les indices (s) et (as) respectivement.

Protocole

Les spectres infrarouges des différents échantillons sont enregistrés sur un spectromètre du type Perkin-Elmer. L'enregistrement a été effectué dans la région spectrale

située entre 400 et 4000 cm^{-1} , avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le spectre obtenu représente $\frac{I}{I_0} = f(\nu)$ où I_0 et I représentent respectivement les intensités incidente et transmise par l'échantillon et ν le nombre d'onde = $\frac{1}{\lambda}$ exprimé en cm^{-1} .

La grandeur physique placée en ordonnée de ces spectres infrarouges peut correspondre à la transmission $T = \frac{I}{I_0}$, soit à l'absorbance $A = -\text{Log}(T)$. Dans le spectre d'absorption d'un matériau de composition chimique et de structure donnée, chaque bande correspond à des mouvements de vibration des atomes ou groupements atomiques composants le matériau permettant ainsi de l'identifier.

IV-1- 2- Diffraction des rayons X (DRX)

La technique de diffraction par les rayons X permet de déterminer l'arrangement des atomes constitutifs d'une structure. Cette méthode permet d'obtenir des informations à des échelles de l'Angström. Lorsque la longueur d'onde λ d'un rayonnement incident est du même ordre de grandeur que les distances inter réticulaires (d) d'un cristal ou d'une poudre (dans notre cas), il y a interaction rayonnement-matière suivant la relation de Bragg :

$$2d \sin \theta = \lambda$$

Les diagrammes ont été obtenus sur l'appareil INEL CPS 120 du LCSIM, la géométrie INEL permet une acquisition simultanée suivant toutes les valeurs de θ comprises entre 10° et 70° (2θ).

L'échantillon finement broyé est placé sur un porte échantillon en rotation.

IV-1-3- Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique non destructive, dont le principe est basé sur l'interaction électrons-matière. Cette technique permet d'obtenir des images 2D ou 3D des matériaux, à partir des électrons secondaires ou rétrodiffusés ainsi que de voir les contrastes de composition chimique du matériau. Un faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon. L'interaction du faisceau avec la matière donne naissance à un ensemble de particules ou rayonnements : électrons secondaires, électrons Auger, rayons X ou électrons rétrodiffusés [Goldstein *et al*, 1992]. L'observation de la surface des verres et la

réalisation d'images ont été effectuées par la collecte des électrons secondaires (contraste topographique) ou rétrodiffusés (contraste chimique, émis par la surface des échantillons).

En particulier, les électrons secondaires sont formés lors d'un choc entre les électrons primaires du faisceau et les atomes de l'échantillon : un électron primaire peut céder une partie de son énergie à un électron peu lié de la bande de conduction de l'atome, provoquant ainsi une ionisation par éjection de ce dernier. Ces électrons ont généralement une faible énergie (environ 50 eV) et proviennent des couches superficielles (environ 10 nm) des échantillons. Ces électrons permettent donc d'obtenir des informations sur la topographie des échantillons.

En revanche, les électrons rétrodiffusés sont dus à la diffusion inélastique des électrons du faisceau incidente suite à leur interaction avec les noyaux des atomes de l'échantillon. Ces électrons, possédant une énergie plus élevée (jusqu'à 50 keV) comparés aux électrons secondaires, proviennent d'une profondeur plus importante dans l'échantillon. De plus, ces électrons sont sensibles au numéro atomique des atomes constituant l'échantillon : les atomes les plus lourds (ceux ayant un nombre important de protons) réémettront plus d'électrons que les atomes plus légers. Cette particularité est utilisée pour l'analyse en électrons rétrodiffusés.

Les zones formées d'atomes avec un nombre atomique élevé apparaîtront plus brillante que d'autres : c'est le contraste de phase.

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée au cours de cette étude afin d'évaluer la morphologie des échantillons, ainsi que la présence de l'hydroxyapatite à la surface des verres synthétisés. Pour les analyses des échantillons, un microscope Jeol JSM 6301F équipé d'un canon d'émission d'électrons à effet de champ a été utilisé. Cet appareil, disponible au sein du Centre de Microscopie Electronique à Balayage et micro Analyse (CMEBA) de l'université de Rennes 1, permet d'obtenir des images avec résolution pouvant aller jusqu'au nanomètre. Le principe d'un canon à émission de champ est d'utiliser une cathode métallique en forme de pointe très fine et d'appliquer une tension de l'ordre de 2000 à 7000 V entre la pointe et l'anode. Cela permet la production d'un champ électrique très intense (environ 10^7 V.cm^{-1}) à l'extrémité de la cathode (pointe). Les électrons sont alors extraits de la pointe par effet tunnel. Le principal avantage des canons à émission de champ est une brillance théorique (rapport du courant émis par la source au produit de la surface de la source par l'angle solide) très élevée ainsi qu'une meilleure maîtrise de la stabilité de l'émission.

Les échantillons sous forme de poudre (taille des grains entre 40 et 63 μm) ont été déposés sur scotch graphite, monté sur un support en laiton. Pour un bon écoulement des charges, du matériau vers le support, il est nécessaire de métalliser nos échantillons, qui sont non conducteurs. Une métallisation de l'échantillon, par dépôt d'une fine couche d'or-paladium, permettant un meilleur écoulement des charges a été réalisée avant les observations MEB.

IV-1-4- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Présentation générale de la RMN (Figure 5)

C'est un phénomène par lequel un noyau absorbe les rayonnements électromagnétiques d'une fréquence spécifique en présence d'un fort champ magnétique. Isidore Isaac Rabi, physicien américain né en Autriche en 1898 et mort en 1988, a découvert le phénomène de résonance magnétique en 1938. Dès lors, la résonance magnétique a été appliquée à la détection des atomes légers (tels que l'hydrogène, présent dans les hydrocarbures) et a été utilisée, en raison de son caractère non destructeur, pour étudier le corps humain.

Principe de la RMN

On peut considérer chaque noyau d'un atome comme une "toupie" qui possède un spin nucléaire. La RMN est une technique de spectroscopie appliquée aux atomes qui ont un spin nucléaire non nul: le noyau d'un tel atome absorbe les rayonnements électromagnétiques d'une fréquence spécifique, en présence d'un fort champ magnétique.

le noyau étant chargé positivement, le mouvement de spin nucléaire engendre un moment magnétique. Le noyau se comporte comme un minuscule "barreau aimanté". Ce moment magnétique microscopique placé dans un champ magnétique extérieur H_0 peut avoir deux niveaux d'énergies possibles. En effet, il a la possibilité de s'orienter parallèlement ou anti parallèlement à ce champ magnétique. Les orientations parallèle et antiparallèle ont des niveaux d'énergie différents.

Le principe de la RMN est donc de faire passer le moment magnétique nucléaire du niveau de plus basse énergie à celui de plus grande énergie : transition de l'état a vers l'état b par absorption d'un photon. Lorsque l'énergie du photon permet cette transition il y a résonance.

Pour les champs usuels (de l'ordre du tesla) la résonance du proton a lieu dans le domaine des ondes radio (100 MHz environ).

La différence d'énergie, ΔE , entre les deux états (parallèle et antiparallèle) dépend directement de la force du champ magnétique H_0 :

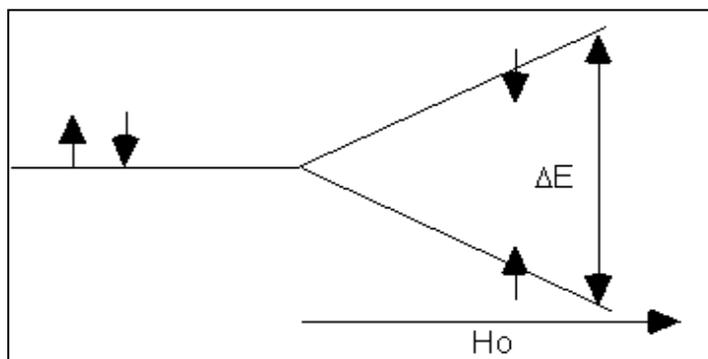


Figure 5. La fréquence d'absorption est égale à $\nu = k \cdot H_0$

$$k = h \times \frac{\gamma}{2\pi}$$

h : constante de Planck

γ : rapport gyromagnétique (constante pour un noyau donné).

IV-1-5- Spectrométrie par diffusion Raman (RMAN)

Principe et effet Raman

La spectroscopie Raman a été introduite par sir Chandrasekhar Venkata RAMAN en 1930, ce qui lui valu le prix Nobel de physique pour la découverte de l'effet Raman. Cette technique est relativement simple : elle consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon à étudier et à analyser la lumière diffusée.

On utilise cette méthode car elle est facile à mettre en œuvre, précise et rapide dans des conditions de hautes pressions. L'interprétation ne permet pas une analyse structurale mais elle est très sensible aux transitions de phase. Il est d'ailleurs intéressant de coupler cette méthode avec des résultats de simulation informatique.

L'effet Raman : depuis l'échantillon, les photons incidents sont détruits et leur énergie sert à créer des photons diffusés. Ceux-ci servent à créer (processus Stokes) ou détruire (processus anti-Stokes) des vibrations dans l'échantillon étudié. L'effet Raman sonde donc

des vibrations dans les matériaux. Il s'agit d'une diffusion inélastique car il y a un échange d'énergie entre le photon incident et l'échantillon.

Le spectre Raman

Les mesures de Raman se font tout simplement à l'aide d'un spectromètre n'ayant pas de caractéristiques particulières, et une source excitatrice monochromatique (Laser). Si lors de l'excitation on n'a pas d'échange particulier (comme sur la figure 6), la diffusion est dite élastique et appelée diffusion de Rayleigh : cette diffusion correspond en fait au laser seul.

On obtient de la diffusion de Raman, un spectre comme celui-ci

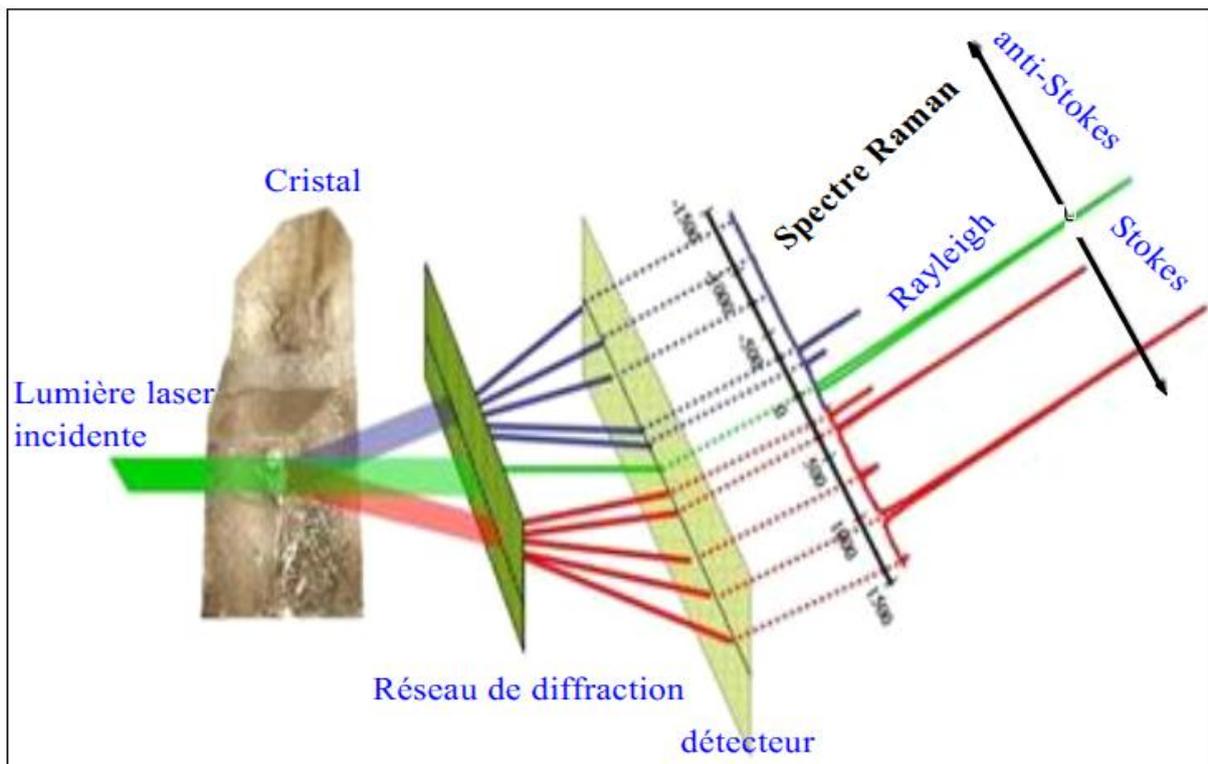


Figure 6. Principe et exemple de spectre Raman

On observe ici les raies Stokes, anti-Stokes et de Rayleigh :

La raie Rayleigh est, comme dit ci-dessus, la raie correspondant à aucun échange d'énergie entre l'échantillon et le photon incident. Le photon diffusé est donc le même que le photon incident car il ne crée aucune vibration.

Les raies Stokes correspondent à un décalage en longueur d'onde vers le rouge avec la création de phonons.

Les raies anti-Stokes correspondent à un décalage en longueur d'onde vers le bleu avec l'absorption de phonons.

Le décalage en nombre d'onde (le Raman shift (cm^{-1}) est propre à la structure du matériau et ne dépend pas de la source d'excitation. On peut alors analyser la structure des matériaux ainsi que l'évolution de celle-ci.

L'intensité des raies est directement liée au nombre de molécules d'un même mode vibrationnel.

IV-1-6- Ultraviolet- visible (UV-VIS)

La spectroscopie UV-visible a été utilisée pour déterminer la quantité en risèdronate dans les solutions d'adsorption et pour estimer la quantité de risèdronate fixée par le verre bioactif lors de l'adsorption. Les molécules de risèdronate présentent un maximum d'adsorption (λ max) du Rayonnement UV à 262 nm. Cette longueur d'onde correspond aux groupements pyridine de la molécule d'adsorbat. La concentration du risèdronate a été déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert:

$$A = e \cdot C \cdot l$$

A: absorbance,

e: coefficient d'extinction molaire (cm^2/mol),

l: distance (cm) parcourue par le faisceau lumineux dans l'échantillon,

C: concentration de l'adsorbat (mol/l)

Une courbe d'étalonnage a été établie, pour chaque cas étudié. Le coefficient d'extinction molaire du risèdronate (e) déterminé à partir de l'ensemble des droites obtenues est de $(3,77 \pm 0,01) \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Il est proche de $3,90 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, valeur rapportée dans la littérature [Vallano et al, 2003]

IV-1-7- Spectrométrie d'émission optique : ICP-OES

a-Principe

La spectrométrie d'émission optique ou ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry) 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 aux ppm, selon la matrice à analyser.

Les échantillons solides à analyser doivent se présenter sous forme de solution et sont donc préalablement dissous dans de l'acide. Les solutions sont ensuite nébulisées, puis

ionisées par pulvérisation dans un plasma d'argon, c'est-à-dire que les atomes de la matière à analyser sont transformés par le plasma à très haute température (jusqu'à 8 000 K) en ions, dont les électrons périphériques sont excités.

Leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission de photons dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément. La lumière émise par l'élément recherché est mesurée par un détecteur circulaire. Ce dernier mesure simultanément les intensités émises entre 100 et 800 nm, grâce à deux réseaux et 19 capteurs CCD (Charge Coupled Device) disposés le long du cercle. L'intensité mesurée est enfin comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connue (solution étalon), analysé dans les mêmes conditions.

b-Protocole expérimental

Nos échantillons ont été mis en solution dans de l'acide nitrique à 2 %. S'ils se présentent déjà sous forme liquide, 2 % d'acide nitrique est également rajouté dans les solutions. Une fois acidifiées, les solutions sont envoyées au nébulisateur, grâce à une pompe isostatique, puis pulvérisées en fines gouttelettes (spray) dans la chambre de nébulisation. Le spray est ensuite transporté vers le plasma grâce à un courant d'argon.

L'ICP-OES est une méthode comparative. Une solution d'acide nitrique à 2 % permet de faire le « zéro » pour la calibration. Pour chaque série d'analyses, six solutions étalons multi élémentaires de concentrations connues sont préparées de façon à encadrer les valeurs théoriques à analyser.

L'analyse de ces solutions étalons permet ainsi de tracer des droites d'étalonnage en concentration pour chaque élément à mesurer dans nos échantillons. Les longueurs d'ondes caractéristiques des atomes émetteurs analysés sont choisies de façon à minimiser les interférences

IV-2-Analyses biologiques

IV-2-1- Etude hématologique et biochimique dans le sérum sanguin

IV-2-1-1- Détermination des paramètres hématologiques

Au cours du 1er protocole nous avons utilisé l'automate électrique qui donne directement la NFS (Numération Formule Sanguine). Ce test est réalisé dans la première heure qui suit le sacrifice des animaux sur les échantillons sanguins prélevés sur EDTA, en utilisant 2 automates électriques : Coulter type S880 et coulter maximum. Ce test nous permet de déterminer des paramètres hématologiques à savoir :

Le nombre de globules rouges par mm³ de sang.

Le nombre de globules blancs par mm³ de sang.

L'hématocrite (Ht) en %.

Le taux de plaquettes par mm³ de sang.

L'hémoglobine (Hb) en gramme/100 ml de sang.

Le VGM : volume globulaire moyen en μm³ / GR ou fl/GR.

$$VGM = \frac{\text{Hématocrite}}{\text{Nombre de } \frac{GR}{mm^3} \text{ sang}} = \frac{mm^3 \frac{GR}{mm^3} \text{ sang}}{\text{Nombre de } \frac{GR}{mm^3} \text{ sang}} = \frac{mm^3}{GR}$$

La CGMH : concentration globulaire moyenne en hémoglobine : c'est la quantité d'Hb contenue dans la masse globulaire, elle est exprimée en g Hb/ml GR ou μg Hb/μl GR ou μg Hb/mm³ GR.

$$CGMH = \frac{[Ht] \text{ sanguine}}{Ht} = \frac{\mu g \frac{Hb}{mm^3} \text{ sang}}{mm^3 \text{ de } \frac{GR}{mm^3} \text{ sang}} = \frac{\mu g Hb}{mm^3 GR}$$

- La TGMH : Teneur globulaire moyenne en Hémoglobine : c'est la quantité d'Hb contenue dans une hématie elle est calculée par la formule. Le TGMH est exprimé en pg Hb/GR.

$$TGMH = \frac{[Hb] \text{ sanguine}}{\text{Nombre de } \frac{GR}{mm^3} \text{ sang}} = \frac{\mu g \frac{GR}{mm^3} \text{ sang}}{\text{Nombre de } \frac{GR}{mm^3} \text{ sang}} = \frac{\mu g Hb}{GR}$$

IV-2-1-2- Evaluation des paramètres biochimiques

Dosage du calcium

a-Principe

Le calcium forme avec le complexant crésolphtaléine en milieu alcalin un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium (kit biomaghreb (ref : 90004)).

b-Mode opératoire

Longueur d'onde : 580 nm (550 -590)

Température : 20-25c°

Cuve : 1cm d'épaisseur

On ajuste le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	20µl	-
Echantillon	-	-	20µl
Mélange réactif	1ml	1ml	1ml

On mélange et on incube la solution 5mn à une température ambiante puis on lit la densité optique (D.O) à une longueur d'onde de 580 nm.

c- Calcul

Pour le taux de calcium sérique:

Le calcul se fait par la formule suivante :

D.O.Echantillon /D.O.Standard *n, avec n= valeur du standard

mg / l n=100

mg /dl n=10

mmol /l n=2.5

Pour le dosage dans le sang, le calcul se fait par la formule suivante :

$$\text{Résultat} = \frac{\text{Abs (dosage)}}{\text{Abs} \times \text{concentration de l'etalon} \times \text{facteur de déléition}}$$

Dosage du phosphore

a-Principe

En milieu acide, les ions phosphate forment avec le molybdate d'ammonium un complexe phospho-molybdique. L'absorbance mesurée à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en ion phosphate dans le spécimen (kit biomaghreb (Réf : 88656)).

b-Mode opératoire

	Blanc	Blanc spécimen	Etalon	Dosage
Réactif	1ml		1ml	1ml
Solution Nacl		1ml		
Eau minéralisé	20µL			
Etalon			20µL	
Spécimen		20µL		20µL

L'absorbance est déterminé à 340nm

c-Calcul

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

$$Résultat = \frac{Abs (dosage)}{Abs \times concentration de l'etalon}$$

Pour le dosage sérique, le calcul se fait par la formule suivante :

$$Résultat = \frac{Abs (dosage)}{Abs \times concentration de l'etalon \times facteur de délétion}$$

Dosage de la phosphatase alcaline

a-Principe

La détermination cinétique de l'activité phosphatase alcaline (PAL) est faite selon la méthode recommandée par la société allemande de chimie clinique (DGKG) (Réf : 20016).

La réaction est la suivante :



b-Mode opératoire

Par un technique manuelle et on doit porter le réactif et l'échantillon à une température ambiante.

Introduire dans une cuve de 1 cm de trajet optique	
Réactif	1ml
Laisser la température s'équilibrer à 37°C puis ajouter :	
Spécimen	10ml
Mélanger. Après 1 mn, lire l'absorbance à 405 nm puis toutes les minutes pendant 3mn	
Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute (Δ Abs/min)	

c-Calcul

Le calcul se fait celons la formule suivantes :

$$Résultat = \frac{IU}{L} = \frac{\Delta(Abs)}{min} \times 5450$$

IV-2-2- Exploration du stress oxydant et mesure des enzymes impliquées dans le stress oxydant

Préparation des extraits cytosoliques (Sg)

Un fragment d'organe (1g d'os) a été broyé dans 2 ml de TBS pH 7,4 (voir annexe) à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-turax. Après homogénéisation, on a procédé à une centrifugation de l'homogénat tissulaire à 9000 tours/min à 4°C et pendant 15 min afin de récupérer le surnageant : c'est l'extrait cytosoliques (Sg) qui sert pour les différents dosages.

Dosage des protéines totales cytologiques

a-Principe

Le réactif de Folin (acide phosphotungstique et phosphomolybdtique) donne une coloration bleue avec la tyrosine, le tryptophane, la cystéine et d'autres acides aminés.

En combinant le réactif de Folin avec le réactif de Biuret, Lowry et al [Lowry *et al*, 1951] ont monté cette technique pour réaliser le dosage des protéines. C'est une technique très sensible (10 à 20µg). Cependant, ce dosage fait intervenir non seulement les liaisons peptidiques (Biuret) mais aussi certains acides aminés spécifiques (réaction de Folin).

Le principe de cette méthode consiste à déterminer les concentrations en protéines cytosoliques en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de solutions de référence de titres connus en BSA (Bovine sérum albumine) [Lowry *et al*, 1951]

b-Protocole expérimental

Dans des tubes en plastiques on introduit dans l'ordre :

0,2 ml d'extrait (Sg) dilué d'os.

2 ml du mélange réactionnel composé de : Na₂CO₃ 2% dans NaOH 0,1N (4g/l), tartrate double de Na et K 10 % et CuSO₄ 5 % dans les proportions (50V/1V/1V) ;

0,2 ml de réactif de Folin (Sigma) préalablement dilué au ½ avec l'eau distillée et maintenu à l'obscurité à une température de 4° C.

Après agitation, les tubes sont mis à l'obscurité à température ambiante durant 30 minutes. Le réactif de Folin produit ainsi un complexe soluble, de couleur bleue.

La densité optique est déterminée à une longueur d'onde de 490 nm contre un blanc contenant le tampon d'homogénéisation préparé dans les mêmes conditions que les échantillons et les étalons.

La quantité de protéines est calculée en µg/ml, à partir d'un courbe étalon réalisé avec bovine sérum albumine (BSA) à partir de laquelle a été préparée une gamme de concentrations croissantes (0 µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, 200µg/ml).

c-Calcul

Les taux de protéines sont calculés en µg/ml d'extrait en se référant à la courbe d'étalonnage et tenant compte des dilutions utilisées.

Cette courbe est de la forme « $y = a x + b$ »

Avec : $y = DO$

$$X = \frac{\text{Concentration en protéines en } \mu\text{g}}{\text{ml}} = \frac{y - b}{a}$$

La concentration de protéines est convertie en mg/ml pour le calcul des activités enzymatiques.

IV-2-2-1- Mesure du niveau de la peroxydation lipidique (TBARS)

La mesure du niveau de la peroxydation lipidique (LPO) a été évaluée par la mesure des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) comprenant des aldéhydes (dont le MDA) et les lipides hydroperoxydés.

Malondialdéhyde ou MDA est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique

a- Principe de mesure du niveau de la peroxydation lipidique (TBARS)

Après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec le TBA (Acide thiobarbiturique) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en deux molécules de TBA et une molécule de MDA [Esterbauerh, 1993].

b - Protocole expérimental de mesure du niveau de la peroxydation lipidique (TBARS))

Dans des tubes en plastique on introduit dans l'ordre :

125 µl de l'extrait : cytosol déjà préparé ;

50 µl de tampon TBS pH 7,4;

125 µl de TCA-BHT pour déprotéiniser l'extrait ;

Le contenu des tubes est vortexé puis centrifugé à 1000 tours /min pendant 10 min, on prélève 200 µl de surnageant de chaque tube et on y ajoute :

40 µl de HCl (0,6 M)

160 µl de tris TBA

On agite les tubes au vortex puis on incube à 80 °C pendant 10 min et on lit la DO à 530 nm ; l'absorbance est directement proportionnelle à la quantité des TBARS.

c-Calcul du niveau de la peroxydation lipidique (TBARS)

La concentration (C), en nmol/mg de protéines, des produits de peroxydation est calculée suivant la loi de Beer-Lambert. La formule globale est donc la suivante :

$$C = \frac{DO \times 10^6}{\varepsilon \times L \times X \times Fd}$$

Avec :

C = concentration du taux de MDA en nmoles/mg de protéines.

ε : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1,56. 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹ = 1,56. 10⁵ mmol⁻¹ cm⁻¹ ml⁻¹.

L : Largeur du trajet optique = 1cm.

X : Concentration de l'extrait en protéine (en mg/ml).

Fd : Facteur de dilution = (Vsgx VS) / (VFi x VF) = 0,2083

* vsg ou le volume de la prise de l'échantillon (125µl)

* VS ou le volume prélevé du surnageant (200µl)

* VFi ou le volume final intermédiaire à la centrifugation (300µl)

* VF ou le volume final à l'incubation (400µl).

IV-2-2-2-Dosage de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

a- Principe du dosage de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

La méthode de dosage de l'activité SOD par le test NBT [Beauchamp *et al*, 1971] est une méthode de photoréduction du complexe méthionine-riboflavine. L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde O_2^- est utilisée comme base de détection de la présence de SOD. Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. La présence de SOD inhibe l'oxydation de NBT.

b- Mode opératoire du dosage de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

Le mode opératoire pour le dosage de l'activité SOD est résumé dans le tableau 2

Tableau 2 : Mode opératoire du dosage de l'activité de la SOD

	Cuve de référence (zéro du spectro) à l'obscurité	Cuve illuminée		Concentration dans le milieu réactionnel
		Totale (B)	Echantillon(E)	
EDTA-Met	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l	EDTA (0,1mM)
Tampon Phosphate	892,2 μ l	892,2 μ l	892,2 μ l	Met (13mM)
Echantillon(Sg)	X μ l	—	X μ l (50 μ l)	—
Tampon Phosphate	1000 – X μ l	1000 μ l	1000-X μ l	50Mm
NBT	85,2 μ l	85,2 μ l	85,2 μ l	75 μ M
Riboflavine	22,6 μ l	22,6 μ l	22,6 μ l	2 μ M

Après incubation à la lumière (lampe de bureau) pendant 20 min

→ Lire la DO à 580 nm.

Un tube préparé de la même manière que le blanc est mis à l'obscurité pendant 20 minutes sert pour l'étalonnage (zéro) du spectrophotomètre.

c- Calcul de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité SOD est déterminée en : « % d'inhibition/mg de protéines » selon la formule :

$$Y = \left[\left(\frac{DO_B - DO_E}{DO_B} \times 100 \right) \times \frac{20}{X} \right] \times Fd$$

Avec:

DOB: densité optique du blanc à la lumière

DOE : densité optique de l'échantillon à la lumière

X : concentration en protéines mg/ml

20 : pour transformer l'inhibition de 50µl à 1000µl

Fd : Facteur de dilution

Une unité SOD correspond à la quantité de protéines qui induit 50% d'inhibition

Y → 1mg de protéine

50 → 50 /y mg de protéine

Y : pourcentage d'inhibition / mg de protéine

50/Y mg de protéine → correspond à une unité SOD

$$1\text{mg de protéine} \rightarrow \frac{1 \times 1}{50/Y}$$

Y/50 unité SOD/mg de protéines

Donc : Activité spécifique SOD = Y/50 Unité SOD / mg de protéines

IV-2-2- 3-Mesure de l'activité catalasique (CAT) [Aebi *et al*, 1984]

a-Principe de mesure de l'activité catalasique (CAT)

Les catalases sont des enzymes tetramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH.

Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces oxygénées réactives et en accélérant la réaction spontanée d'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène

La réaction bilan est : 2H₂O₂ → catalase 2H₂O+O₂

b- Protocole expérimentale de mesure de l'activité catalasique (CAT)

L'activité catalase (CAT) a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible (JENWAY 6105) par la variation de la densité optique consécutive à l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7,4 un volume de 200µl de H₂O₂ (500 mM) sur 20µl de Sg à une température d'incubation de 25° C. Les réactifs ont pour origine Sigma Aldrich.

Le tableau 3, représente les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase.

Tableau 3: Mode opératoire du dosage de l'activité de la Catalase.

	Essai (µl)	Blanc (µl) (totale)
Tampon phosphate (100mM; pH7,5)	780	800
H ₂ O ₂ 50Mm	200	200
Sg (1 à 1,5mg protéine/ml)	20	0

La lecture se fait à 240 nm toutes les 15 secondes durant 90 secondes.

On note que :

Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.

L'activité décroît rapidement ; il est important de mettre toujours le même temps entre le pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.

La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai, durant 90 secondes de mesures et à 25 °C (température ambiante).

c-Calcul de l'activité catalasique (CAT)

L'activité catalasique est exprimée en µmole H₂O₂ hydrolysées/min/mg de protéine.

$$\text{Activité catalasique} = \frac{\Delta(\text{DO})/\text{min}}{E \times L \times 0,02 \times X} \times \text{Fd}$$

Avec :

E : coefficient d'extinction : 0,043 mmol⁻¹ cm⁻¹ l⁻¹ = 0,043 µmol⁻¹ cm⁻¹ ml⁻¹

L : largeur de la cuve : 0,779 cm (longueur du parcours lumineux)

X : concentration en protéines (mg/ml)

0,02 : pour transformer l'activité de 20 µl à 1000 µl

Fd : facteur de dilution de l'échantillon

$$\text{Variation } DO = AF - A_1$$

Avec : A_1 = absorbance à 15 secondes ; AF = absorbance à 75 secondes

Les mêmes valeurs nous donnent l'activité catalase exprimée en « unité catalase » sachant que : une unité est la quantité de catalase qui hydrolyse $1\mu\text{mol}$ de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$.

La molarité de la solution de H_2O_2 est déterminée pour chaque série de dosages de la façon suivante :

$$N_1V_1 = N_2V_2 \Rightarrow N_2 = \frac{N_1V_1}{V_2}$$

Avec :

N_1 : Normalité du thiosulfate de sodium

V_1 : Volume de thiosulfate de sodium

N_2 : Normalité H_2O_2 recherchée

V_2 : Volume H_2O_2 utilisée dans la réaction avec le thiosulfate de sodium

La molarité M est égale à $N_2/2$

A partir de cette molarité, on prépare une solution fille de H_2O_2 500 mM.

IV-2-2- 4-Evaluation de l'activité glutathion peroxydase (GSH-Px)

a- Principe du dosage de l'activité glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité GSH-Px est mesurée par la technique de Flohe et Gunzler (1984) [Flohe *et al*, 1984] modifiée, utilisant le H_2O_2 comme substrat. C'est une méthode qui se base sur l'oxydation du glutathion GSH en présence de DTNB.

L'activité enzymatique GSH-Px est calculée en mesurant le taux de GSH réduit en se référant à la réaction non enzymatique.

b- Mode opératoire du dosage de l'activité glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité GSH-Px a été mesurée à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible (JENWAY 6105) par la variation de la densité optique consécutive à l'oxydation du GSH.

Le tableau 4, ci-dessous représente les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité GSH – Px

Tableau 4 : Mode opératoire du dosage de l'activité de la GPx.

	Essai	Blanc
Echantillon Sg	200µl	–
GSH réduit (0,1 mM)	400µl	400µl
Tampon PO ₄ (pH=7,8) (67mM)	200µl	400µl
Incubation au bain marie à 25°C (5 minutes)		
H ₂ O ₂ (1,3 mM)	200µl	200µl
Laisser 10 minutes au repos		
TCA (1%)	1 ml	1 ml
Mettre le mélange 30 minutes dans la glace Centrifugation à 3000 tours/min (10 minutes)		
Surnageant	480µl	480µl
Na ₂ HPO ₄ (0,32 M)	2,2 ml	2,2 ml
DTNB (1 mM)	320µl	320µl

→ Lire la DO à 412 nm dans les 5 minutes qui suivent l'ajout du DTNB.

Le spectrophotomètre est calibré par le tampon phosphate.

c- Calcul de l'activité glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité GSH-Px est exprimée en : µM GSH réduit/ min/mg de protéines ; elle est calculée selon la formule suivant :

$$\text{Avec: } \mu\text{M GSH}_{\text{réduit disparu}} / \text{min/mg de protéines} = \left[\left(\frac{DO_{\text{essai}} - DO_{\text{blanc}}}{DO_{\text{blanc}}} \right) \times \left(\frac{0,04 \times 5}{X \times 10} \right) \right]$$

X : concentration en protéines (mg/ml)

0,04 : quantité initiale de GSH réduit

5 : pour passer de l'activité dans 200 µl à l'activité dans 1 ml

10 : temps de réaction.

IV-2-3- Etude histologique**Fixation et infiltration**

Après prélèvement, les échantillons osseux sont marqués de façon à connaître la partie distale et la partie proximale sont qui fixés dans le BB'S pendant 24 heures, transférés ensuite dans des tubes de verre avec bouchon en bakélite vissé, déshydratés dans des bains d'acétone et infiltrés par l'MMA (méthyle-méthacrylate) par agitation constante à l'aide de rotatif en vitesse lente. La durée des bains est de 1 heure avec un volume de 5 ml environ. Tous les bains sont réalisés à température ambiante à l'exception du dernier bain d'infiltration qui doit être pratiqué à -20°C pendant une nuit.

La procédure de déshydratation et d'infiltration des pièces osseuses est la suivante :

Bain.....	Produit.....	Durée.....
1.....	acétone+xylène.....	1 H
2.....	acétone+xylène.....	1 H
3.....	acétone+xylène.....	1 H
4.....	Xylène.....	1 H
5.....	MMA sans NN-Diméthylaniline.....	1 H
6.....	MMA sans NN-Diméthylaniline.....	1 H

Inclusion et démoulage des blocs

Elle consiste à transvaser le bain de la veille dans un godet en plastique (Peel-A-Way). La polymérisation s'effectue progressivement à 4°C. La pièce est déposée sur un petit fragment de mousse polyester, recouverte du mélange d'inclusion de façon à former un ménisque. Le prélèvement est identifié avec une étiquette portant la référence de la pièce. Le godet est ensuite bouché et deux plaques de verre sont posées sur le bouchon, l'ensemble permet de créer une atmosphère anaérobie nécessaire à la polymérisation. Les godets sont enfin placés dans le réfrigérateur et de l'eau est mise dans le plateau jusqu'à la mi-hauteur du godet ce qui permet de limiter le pic thermique obtenu au cours de la polymérisation. Le lendemain les blocs peuvent être démoulés et coupés.

Coupe des blocs

Sur les pièces osseuses incluses, des coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome Polycut S Reichert Jung équipé d'un rasoir au carbure de tungstène. Les coupes

sont récupérées dans l'eau à l'aide d'une bande de papier humide, bande de la largeur de la coupe.

Des coupes de 7 μ m d'épaisseur sont réalisées sur des étages différents de la façon suivante : Une coupe pour la coloration de Goldner et une coupe pour le Bleux de borax.

On débite ensuite 30 μ m d'épaisseur du bloc sur lequel aucune coupe n'est récupérée puis on répète 4 fois cette opération en récupérant à chaque fois une coupe.

Les coupes sont colorées puis montées au Néontellan après déshydratation. Les lames sont ensuite serrées à l'aide de pinces en bois pour limiter au maximum le phénomène de plissement.

La procédure suivie est celle décrite par [Chappard *et al*, 2001]

Colorations

Trichrome de Goldner modifié

Elle est basée sur la détection du tissu ostéoïde et du tissu minéralisé. La technique est la suivante :

Incuber les coupes au moins pendant 1h dans l'acide picrique saturé, rincer abondamment dans l'eau distillée. Colorer dans l'Hemalum de Meyer pendant 15 min, puis différencier l'Hemalum de Meyer dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1N (3,6%) jusqu'à ce que l'os ait pris une teinte rose pâle. Rincer à l'eau courante puis virer l'Hemalum de Meyer au bleu dans le carbonate de lithium, ainsi les noyaux de la coupe prennent alors une teinte bleuâtre. Rincer de nouveau à l'eau courante.

Colorer pendant 20 min dans une solution de Fushine Ponceau. Rincer à l'eau acétifiée, placer les coupes pendant 6 min dans l'acide phosphomolybdique-Orange G pour décolorer partiellement les tissus osseux qui était rouge (agiter les coupes de temps en temps). Ensuite bien égoutter les coupes sans rinçage, les colorer pendant 15 min dans le fast green FCF 0,1% Rincer 2 à 3 fois dans l'eau acétifiée, déshydrater les coupes dans 3 bains de 2-propanol puis 2 bains de méthylcyclohexane. Enfin montage au Néontellan.

IV-2-4- Imagerie médicale (Radiographie, scanner et micro scanner)

IV-2-4-1-Radiographie (X-ray, Scanner)

a- Principe

Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques d'énergie suffisante pour qu'une partie du rayonnement puisse traverser les objets sans être altérée. Les rayons X traversent les corps opaques à la lumière, et en particulier les organismes vivants. L'atténuation du faisceau de rayons X au cours de son passage dans le corps à radiographier n'est souvent pas uniforme. Des différences d'atténuation existent entre les poumons, le cœur et les os par exemple. Ces différences d'atténuation sont essentielles à la formation de l'image radiographique : L'image radiographique résulte de la différence d'atténuation des rayons X dans les milieux traversés

b- Technique

A l'occasion d'une séance d'examen radiographique, l'animal bénéficie :

- D'un cliché de face du tibia opéré avec les articulations sus et sous-jacentes.
- D'un cliché de profil, en évitant la superposition du corps du fixateur externe avec la diaphyse tibiale.

Les clichés ont été réalisés selon les données techniques suivantes et ce pour tous les animaux et pour toutes les séances:

- Appareil : Polymobil III Siemens.
- Nature du rayonnement : 40 kvolts ,500mA, 30msec.
- Incidence crânio-caudale avec le tibia au contact de la plaque.
- Film radiographique analogique de mammographie assurant une définition suffisante de l'image, permettant de visualiser à la fois le tissu osseux et le régénérat, puis numérisation à 300 dpi.
- Cassette : 24×30 cm tube side CURK AGFA EU cassette. Made in Germany curix screens Blue C2.
- Articulation sus (genou) et sous-jacente (tibio-tarsienne) toujours incluses dans le champ.

IV-2-4-2- Micro-scanner

Le micro-scanner permet d'observer la morphologie et de quantifier les volumes osseux sur un échantillon: Mesure d'une tumeur sous cutanée chez la souris NOG avec un pied à coulisse micrométrique échantillon. Il permet également de recueillir les paramètres de la micro-architecture osseuse.

a- Acquisition

Les images ont été obtenues sur un micro scanner General Electric® avec une résolution de 14µm. La tension et l'intensité étaient de 80kV et de 60mA. Huit cent vues ont été obtenues avec un temps d'exposition par vue de 3000 ms. Les zones d'intérêt ont été reconstruites à partir du volume total avant les quantifications grâce au logiciel GEHC MicroView®.

b- Reconstructions et quantification de la surface minéralisée

La quantification de la néoformation osseuse a été faite à partir d'un volume 3D représentant la région d'intérêt. Ce volume a été déterminé comme un cylindre de 3 mm de diamètre et de 60 coupes d'épaisseur ($60 \times 14 \mu\text{m} = 840 \mu\text{m}$). Il était placé au centre de chaque défaut osseux pour la quantification et correspondait à la forme de chaque défaut osseux.

V-Présentation des résultats et analyse statistique

Les valeurs moyennes ont été exprimées avec leurs écarts types, représentés sur les figures par un trait vertical (barre d'erreur). La comparaison a été estimée à l'aide d'un logiciel PC SPSS 10.0 en utilisant le test de Student Fisher.

Résultats et discussions

*Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-
chimique des verres bioactifs associés au risédronate
(46S6-xRIS)*

I-Introduction

Notre étude consiste à l'association de deux matériaux : verre bioactif avec des bisphosphonates tel que le risédronate. Le risédronate est un bisphosphonate qui appartient aux amino-bisphosphonates (N-BPs). Ces derniers possèdent une fonction amine sur l'une des chaînes latérales ; la fonction amine peut être présente dans ces dérivés sous forme d'un groupe aminoalkyle (dérivé de seconde génération) ou sous forme d'un hétérocycle avec un ou plusieurs atomes d'azotes (dérivé de troisième génération) [Siris *et al*, 1996]. De même le risédronate possède un potentiel anti-ostéoporotique fortement élevé par rapport aux autres bisphosphonates. L'association a été réalisée au moyen du phénomène d'adsorption. Différentes teneurs du risédronate (8, 12 et 20% en masse) ont été ajoutées au verre bioactif (46S6) pour former des biocomposites 46S6-xRIS respectivement : 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS. Les composites obtenus ont été caractérisés au moyen des différentes méthodes physico-chimiques tel que : DRX, FTIR, MEB, ICP-OES, UV, RMN et RAMAN.

II-Résultats

II-1-Caractérisation structurale par diffraction des rayons X des composés 46S6-xRIS

Lors de notre étude nous avons associé deux matériaux le premier qui est amorphe : le verre pur (46S6) et le deuxième : le risédronate qui cristallise dans un système monoclinique ($a = 21,7463\text{\AA}$, $b = 8,9667\text{\AA}$; $c = 15,1193\text{\AA}$; $Z=8$; groupe d'espace C2/c) [Errassifi *et al*, 2011] (Figure 1A)

L'étude a été faite à différents délais du temps pour évaluer la cinétique d'association et de déterminer le temps du seuil du processus d'adsorption.

Le verre pur (46S6) présente un halo de diffraction des rayons X, se situant entre 20° et 40° (2θ). Le diffractogramme de risédronate présente plusieurs raies. Celles obtenues après l'association du verre avec le risédronate pour chaque composé et à différents délais du temps d'incubation (20, 40, 60 et 80 mn) montrent le caractère amorphe. Ceci est expliqué par le fait que l'association de ces deux matériaux ne s'agit pas d'un phénomène de structure mais d'une

simple adsorption. Sachant que l'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules de liquide se fixent sur les surfaces des adsorbants (Figure 1B).

Les molécules ainsi adsorbées constituent l'adsorbat. Dans le cas où les conditions énergétiques ou cinétiques permettent à la molécule de pénétrer au sein de la phase absorbante, il s'agit d'un phénomène d'absorption [Errassifi *et al*, 2011].

En outre, l'adsorption repose sur la possibilité que les surfaces solides fixent certaines molécules de manière réversible, par des liaisons faibles de types Van der Waals. Cette propriété est liée à la structure même du solide où subsistent, en surface, des forces non équilibrées par suite d'une dissymétrie dans la répartition des atomes: la formation d'une couche de molécules adsorbées compense en parti ce déséquilibre.

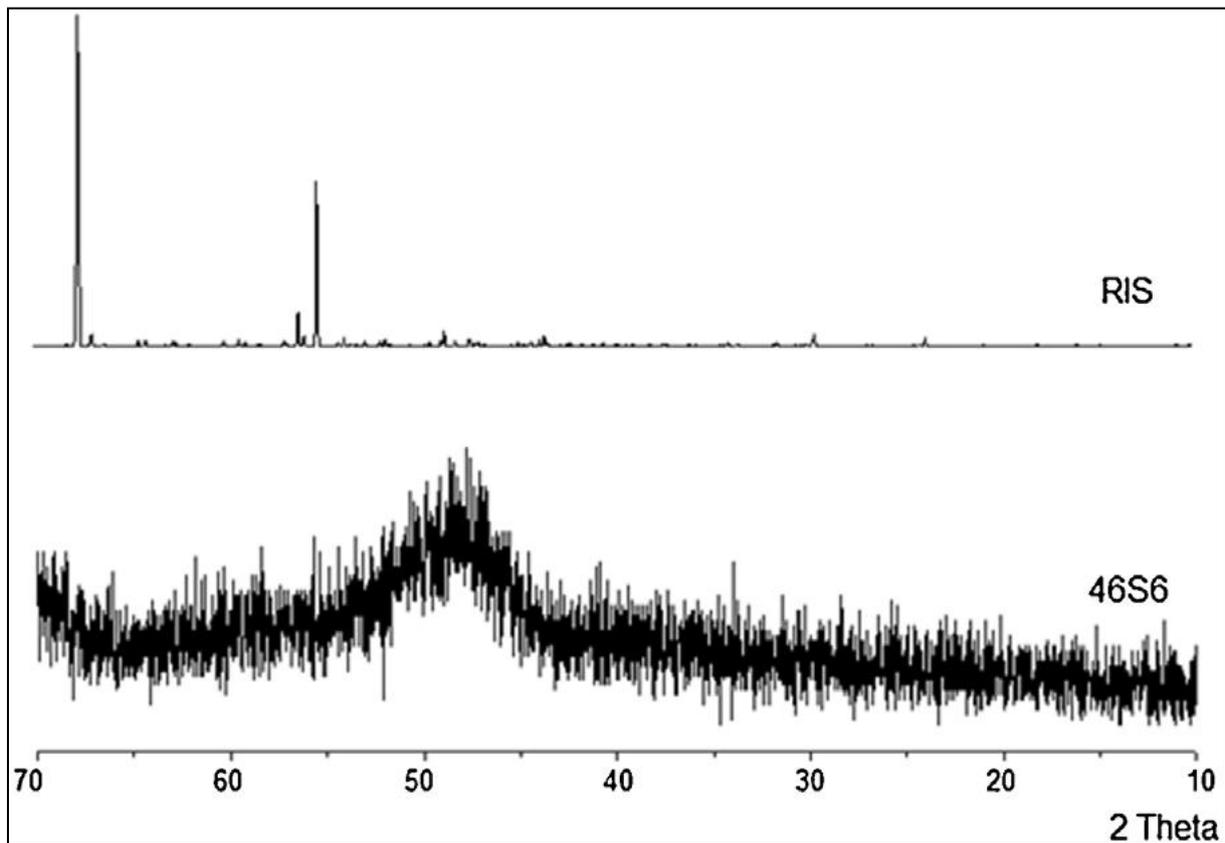


Figure 1A: Diffractogrammes DRX du 46S6 et de risédronate (RIS)

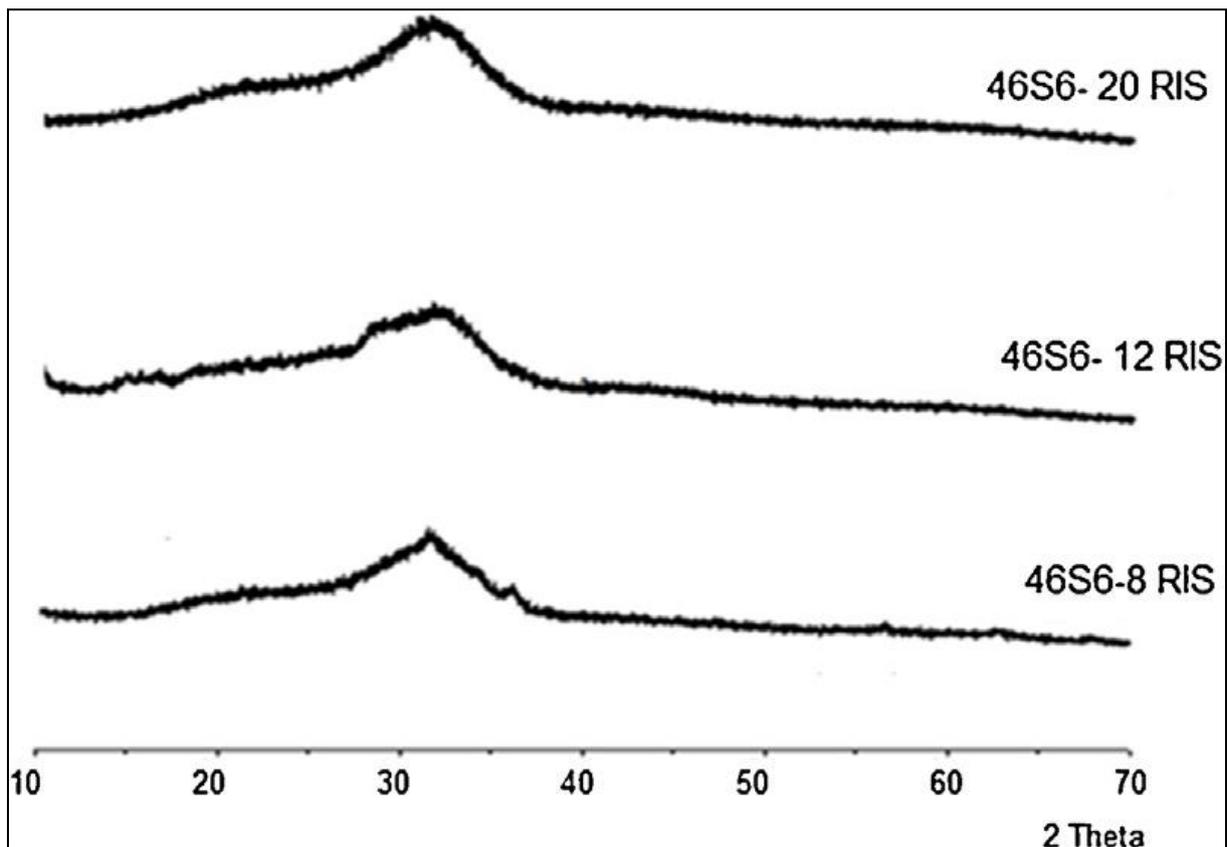


Figure 1B : Diffractogramme DRX de la composite 46S6 -xRIS (après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80)).

II-2-Analyse par spectrométrie infrarouge (FTIR) des composites 46S6-xRIS

Les spectres IR du verre bioactifs (46S6), du risédronate (RIS) et des composites 46S6-xRIS sont présentés dans les figures (2A, 2B, 2C).

Le spectre IR du verre bioactif pur (46S6) montre la présence des bandes caractéristiques de Si-O observées à des longueurs d'ondes 448 cm^{-1} , 685 cm^{-1} , 911 cm^{-1} et 1027 cm^{-1} et des bandes de P-O à des longueurs d'ondes de 537 cm^{-1} et 486 cm^{-1} .

Le spectre IR du bisphosphonate associé au verre 46S6 (risédronate) montre plusieurs bandes parmi lesquelles nous notons les bandes O-H observées à des longueurs d'ondes vers 362 cm^{-1} et 1000 cm^{-1} . Nous notons aussi la présence des bandes de C=O à des longueurs d'ondes de 1700 cm^{-1} et 1130 cm^{-1} . Nous signalons aussi la présence de la bande de C=N, de la bande de C=C et des bandes C-N=O observées respectivement vers des longueurs d'ondes de 1200 cm^{-1} (fonction amide), 1666 cm^{-1} et 1570 cm^{-1} . Finalement, nous remarquons la présence des bandes de P-O à des longueurs d'ondes vers 537 et 468 cm^{-1} .

Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-chimique des verres bioactifs associés au risédronate (46S6-xRIS)

L'association des composites 46S6-xRIS met en évidence la présence des bandes caractéristiques du 46S6 et des bandes caractéristiques du risédronate.

En effet dans ces composites nous détectons la présence de Si-O à des longueurs d'ondes de 911cm^{-1} et 1027cm^{-1} qui sont légèrement décalées et avec une légère diminution d'intensité. Nous signalons aussi la présence de bande C=O située à une longueur d'onde de 1700cm^{-1} et qui est légèrement décalée vers la droite et à 1130cm^{-1} . Elle présente une faible intensité. Nous signalons aussi la présence de la bande de C=N, de la bande de C=C et de la bande C-N=O respectivement à des longueurs d'ondes vers 1200cm^{-1} (fonction amide), 1666cm^{-1} et 1570cm^{-1} et qui sont légèrement décalées. Finalement, nous notons la présence des bandes de P-O à des longueurs d'ondes vers 537 et 468cm^{-1} .

L'observation des bandes caractéristiques du risédronate dans les composites 46S6-xRIS révèle l'augmentation des intensités des bandes caractéristiques du risédronate avec l'augmentation de leurs quantités associées au verre, ceci nous amène à penser que plus la quantité de risédronate est importante plus l'occupation des sites de silicium est élevée. En effet au sein du composite 46S6-20RIS, les bandes de risédronate sont bien développées et mieux observées que celles dans les composites 46S6-12RIS et 46S6-8RIS qui contiennent relativement moins de RIS. Ces bandes augmentent d'intensité entre 20 et 40 min d'incubation puis elles se stabilisent. Ce qui met en relief que le seuil d'adsorption est atteint pour une durée d'incubation variant entre 20 et 40 min.

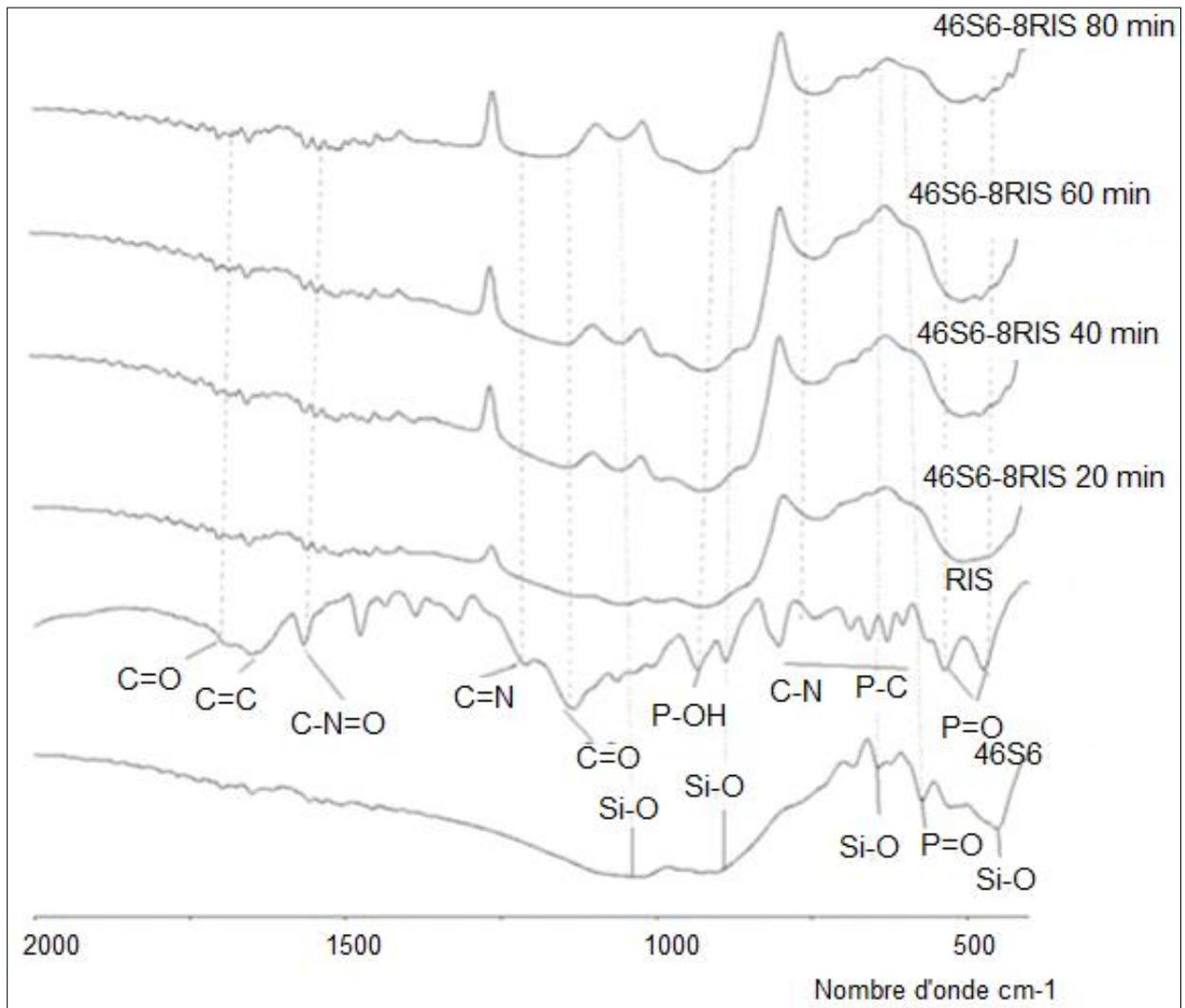


Figure 2A: Spectre infrarouge du composite 46S6-8RIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80 min).

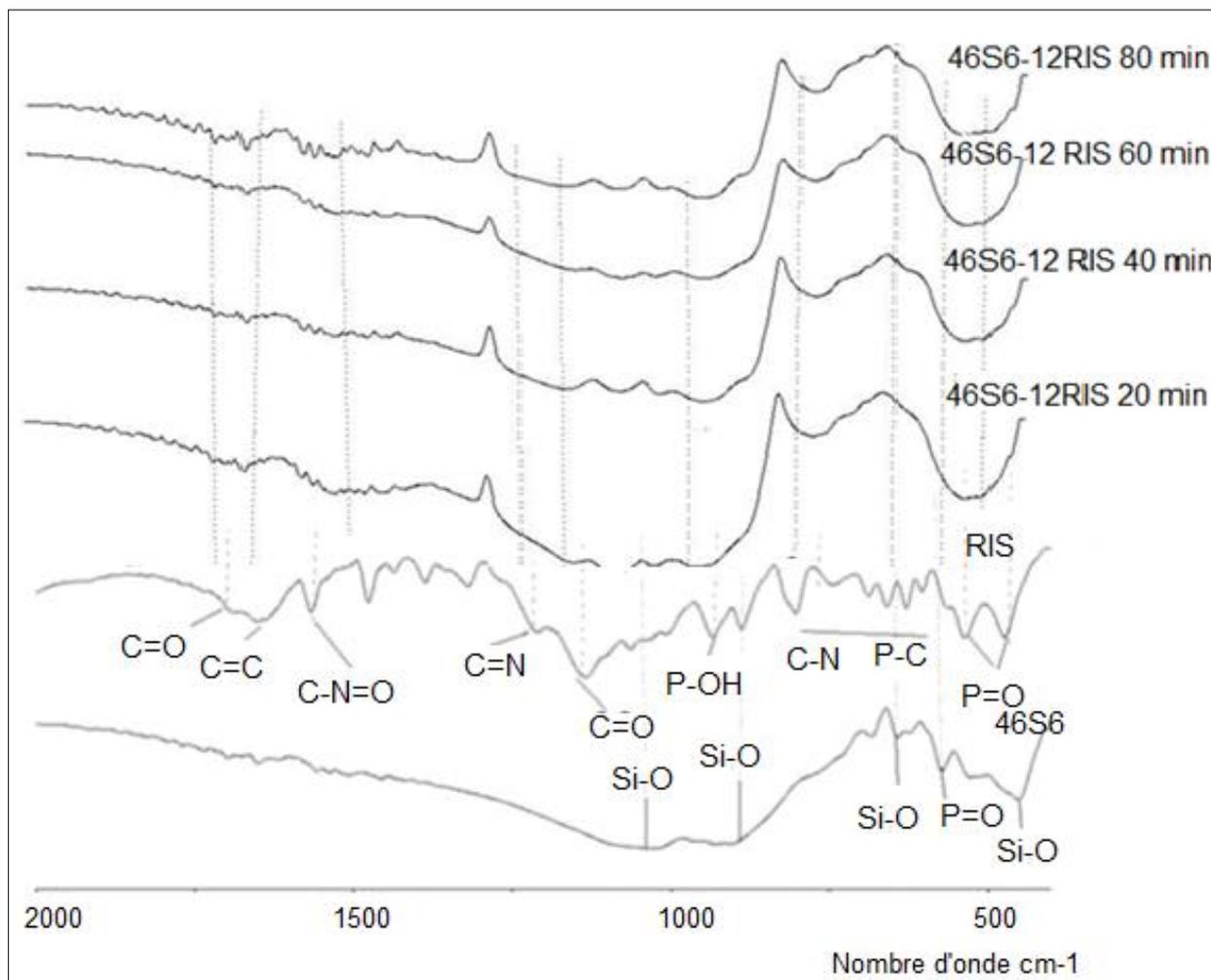


Figure 2B: Spectre infrarouge du composite 46S6-12RIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80 min).

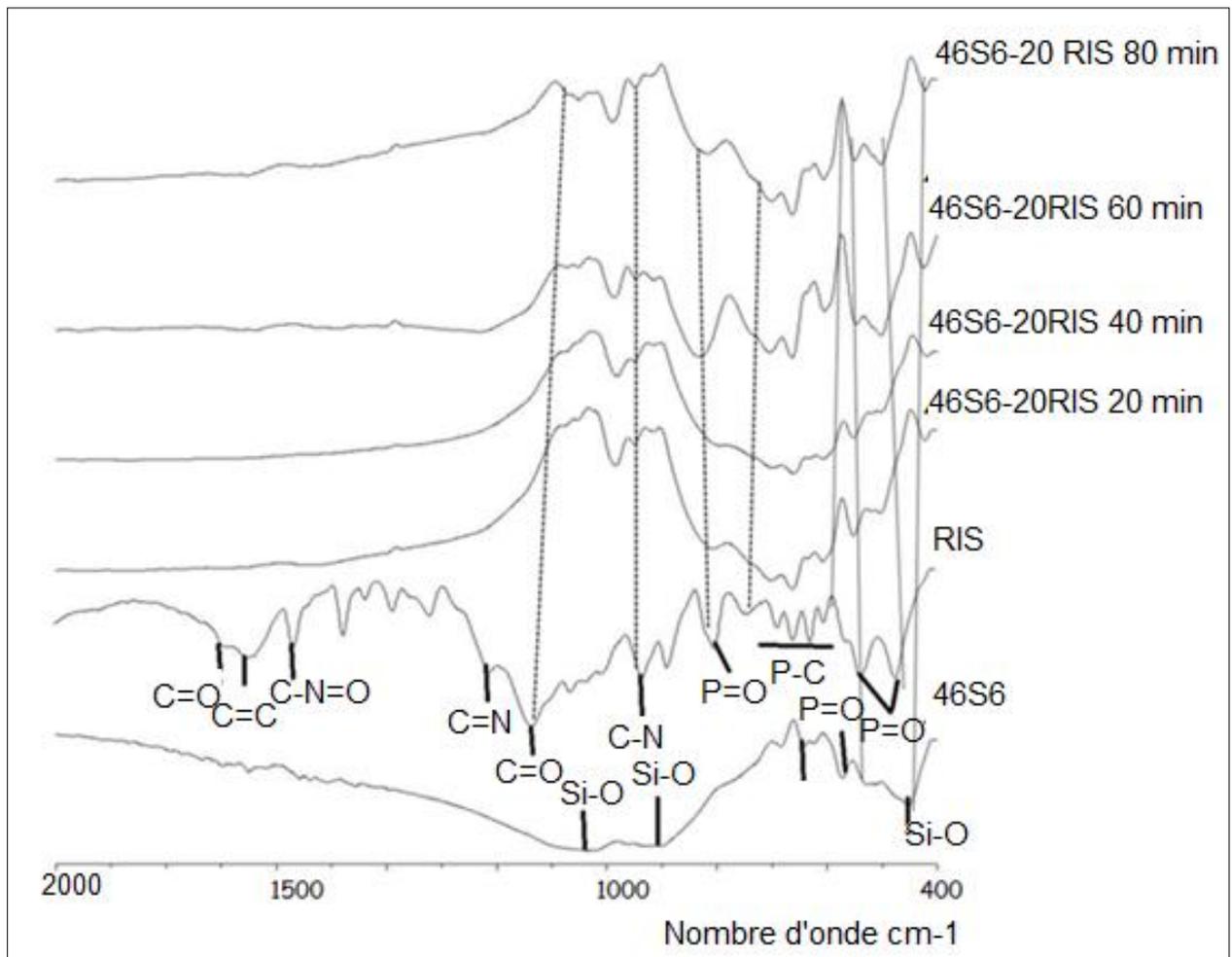


Figure 2C: Spectre infrarouge du composite 46S6-20RIS après différents délais d'incubations dans le KCl (20, 40, 60 et 80 min).

II-3-Investigation morphologique par MEB des composites 46S6-xRIS

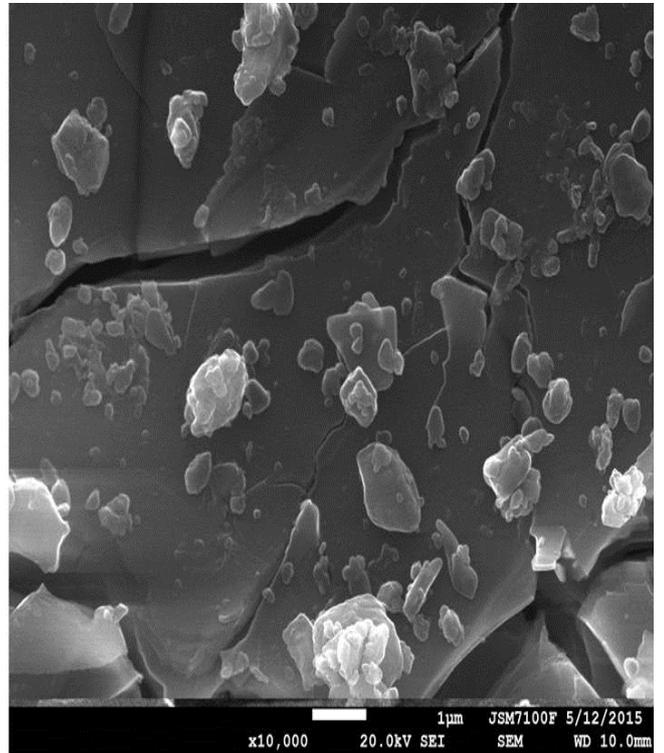
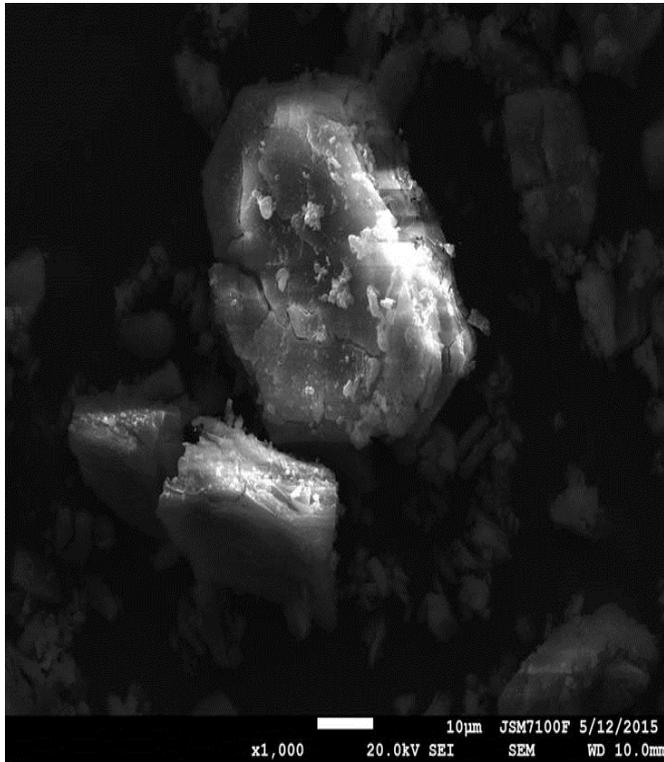
La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique basée sur le principe des interactions électrons –matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon.

Les clichés MEB du risédronate de sodium montrent la présence de blocs formés de lamelles accolées (Figure 3).

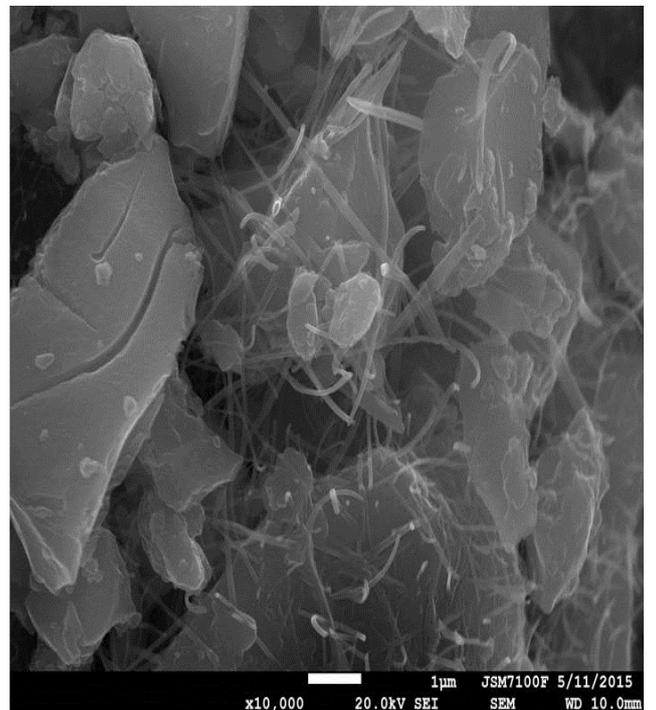
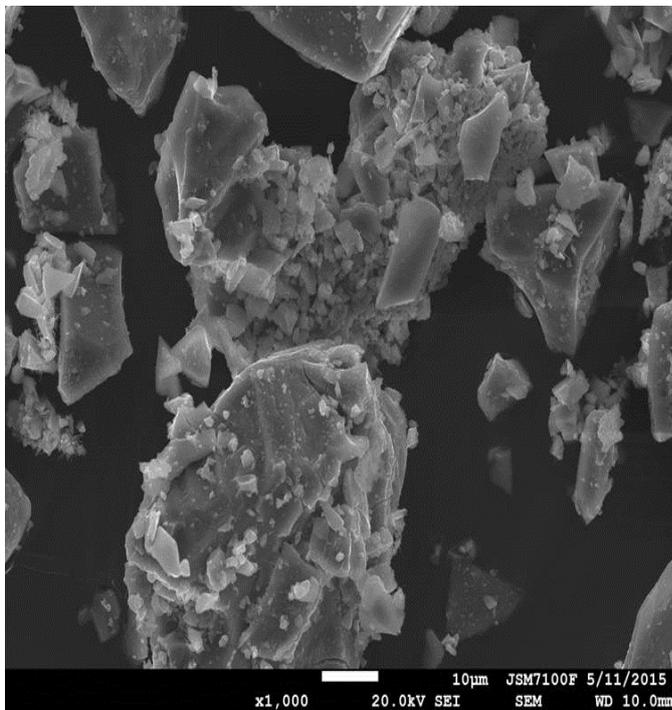
L'association de 8% et 12% de RIS avec le 46S6 montre la présence des filaments qui viennent englober les blocs du verre bioactif. Après l'association du 20% de RIS au verre

Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-chimique des verres bioactifs associés au risédronate (46S6-xRIS)

bioactif nous remarquons que les blocs du verre 46S6 sont presque totalement englobés par les filaments de risédronate (Figure 3).

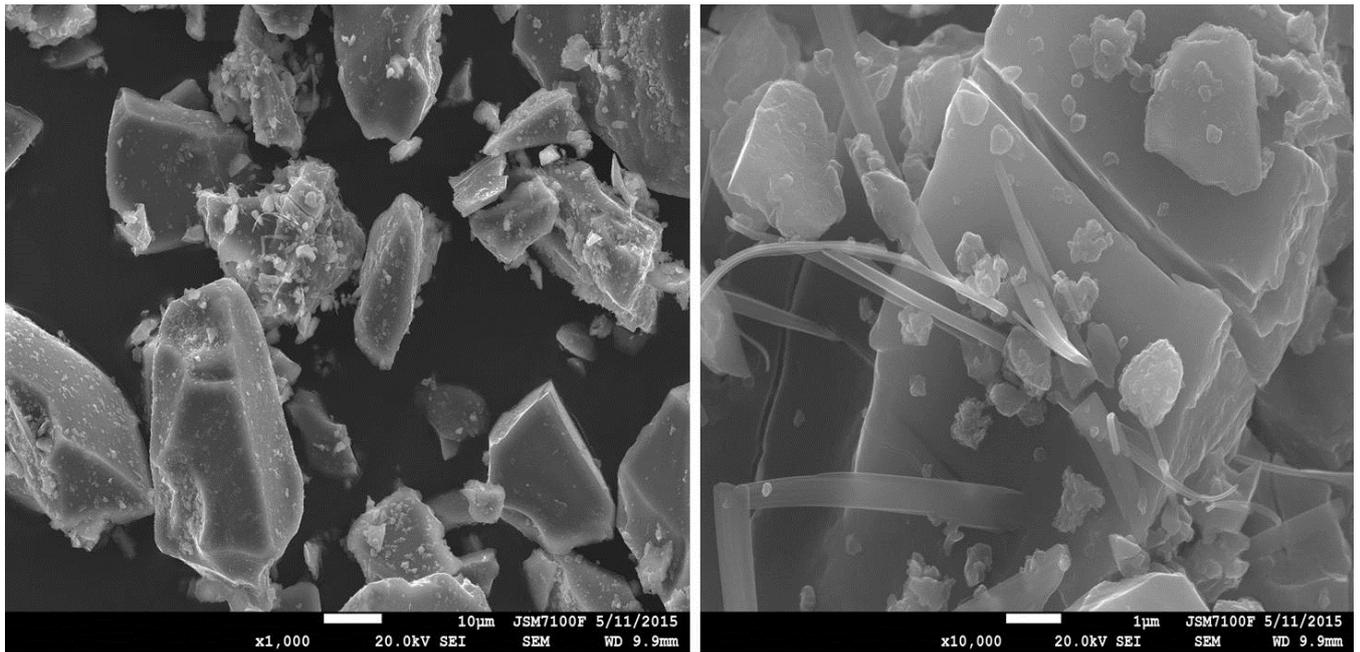


Risédronate



46S6-8RIS

Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-chimique des verres bioactifs associés au risédronate (46S6-xRIS)



46S6-12RIS

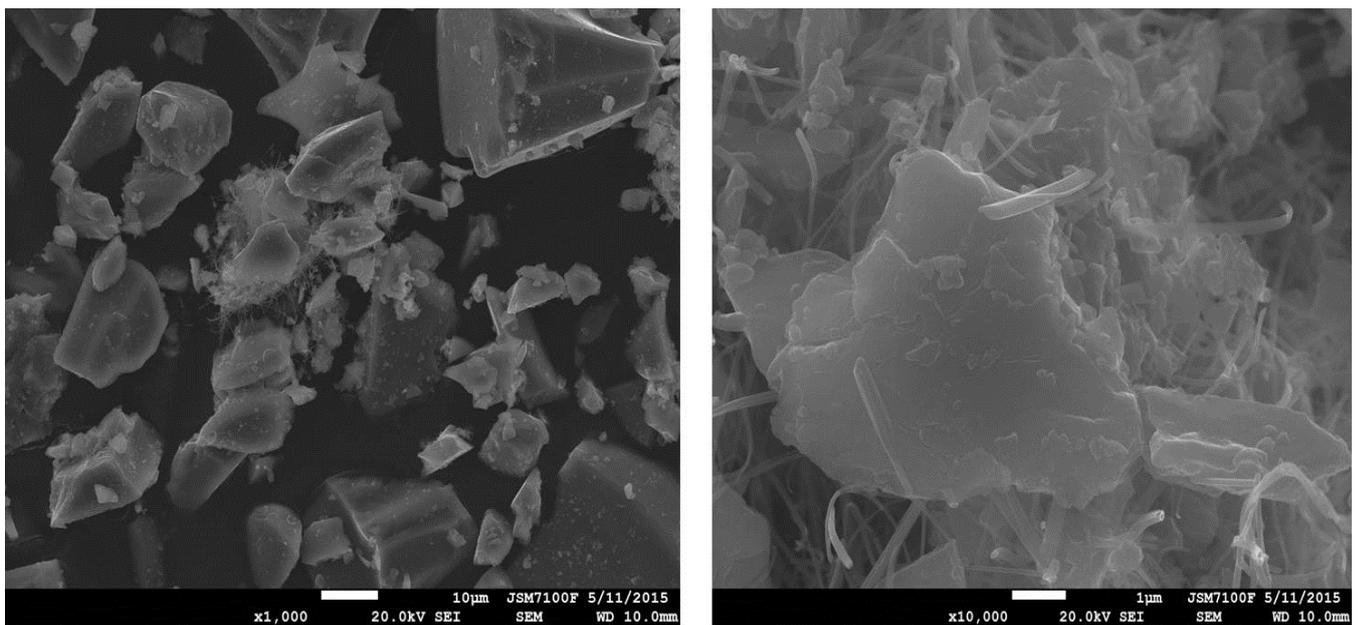


Figure 3 : Clichés MEB du risédronate et des composites 46S6-xRIS (x=8, 12 et 20 %)

46S6-20RIS.

II-4- Etude par MAS-RMN ^{31}P et ^{29}Si

Le phosphore est présent dans les deux matériaux qui forment le composite 46S6-xRIS (46S6 et le risédronate) alors que le silicium n'est présent en abondance que dans le verre bioactif 46S6.

Nous présentons les résultats RMN du silicium sur la figure 4A et le tableau 1. Après la déconvolution du spectre ^{29}Si de 46S6 nous signalons la présence de 2 résonances à environs -80 et -86 ppm. Celles-ci sont caractéristiques du silicium dans l'environnement tétraédrique. La première correspond aux tétraèdres Q^2 avec deux oxygènes pontant [oudadesse *et al*, 2011]. Cette contribution représente environ 84% de la population des tétraèdres SiO_4 . La deuxième résonance correspond aux tétraèdres Q^3 avec 3 oxygènes pontant. Cette contribution représente environ 16% de la population des tétraèdres SiO_4 . Alors que la déconvolution du spectre ^{29}Si de 46S6-8RIS montre la présence des deux espèces avec un léger déplacement chimique à environs -79 et -85 ppm ainsi que l'augmentation de la contribution de l'espèce Q^3 (44%) et la diminution de l'espèce Q^2 (56%). La déconvolution du spectre ^{29}Si de 46S6-12RIS montre la présence des espèces Q^2 (55%) et Q^3 (44%) avec l'apparition d'une nouvelle espèce Q^4 à environs -109 ppm et avec une contribution de 1%. Cette espèce correspond aux tétraèdres avec 4 atomes d'oxygènes pontant. La déconvolution du spectre ^{29}Si de 46S6-20RIS montre la présence des espèces Q^2 (55%) et Q^3 (40%) avec l'augmentation de l'espèce Q^4 dont la contribution est de 5%. Les modifications dans les proportions de ces espèces Q^2 et Q^3 ainsi que l'apparition de la nouvelle espèce Q^4 montre bien l'établissement des liaisons chimiques entre les risédronate et le 46S6 [Mami *et al*, 2007].

Nous présentons les résultats RMN du phosphore sur la figure 4B et le tableau 2. La déconvolution du spectre ^{31}P du 46S6 montre la présence d'une seule résonance Q^0 à environ 7 ppm et de largeur à mi-hauteur d'environ 9 ppm. Ces dernières sont caractéristiques des espèces de phosphores dans un environnement ortho phosphate PO_4^{3-} , elles n'ont aucun oxygène pontant.

Le déplacement chimique obtenu pour le verre est compris entre le déplacement chimique de ^{31}P du composé Na_3PO_4 (10 et 16 ppm) et de ^{31}P du composé $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$ (0 et 3 ppm) ce qui illustre bien l'absence de liaison avec l'un ou l'autre de ces derniers. La déconvolution du spectre ^{31}P du 46S6-8RIS montre aussi la présence de l'espèce Q^0 avec une proportion de 100% et un déplacement chimique légèrement modifié qui est de 8 ppm. La déconvolution du spectre ^{31}P du 46S6-12RIS illustre la diminution de l'espèce Q^0 à 93% et

Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-chimique des verres bioactifs associés au risédronate (46S6-xRIS)

l'apparition d'une nouvelle espèce Q^{RIS1} (1^{ère} espèce caractéristique de RIS) avec un déplacement chimique de 19 ppm et une proportion de l'ordre de 7%.

Le ^{31}P du 46S6-20RIS montre aussi la diminution de l'espèce Q^0 jusqu'au 88% et l'augmentation de la proportion de l'espèce Q^{RIS1} (8%) qui est observée à 18 ppm. Aussi, ce dernier indique l'apparition d'une nouvelle espèce Q^{RIS2} (2^{ème} espèce caractéristique de RIS) avec un déplacement chimique de 15 ppm et une proportion de 4%.

L'apparition des deux espèces Q^{RIS1} et Q^{RIS2} correspond d'après la littérature au déplacement chimique du risédronate ce qui explique la fixation de ces molécules au verre bioactif 46S6 [Jiri *et al*, 2011].

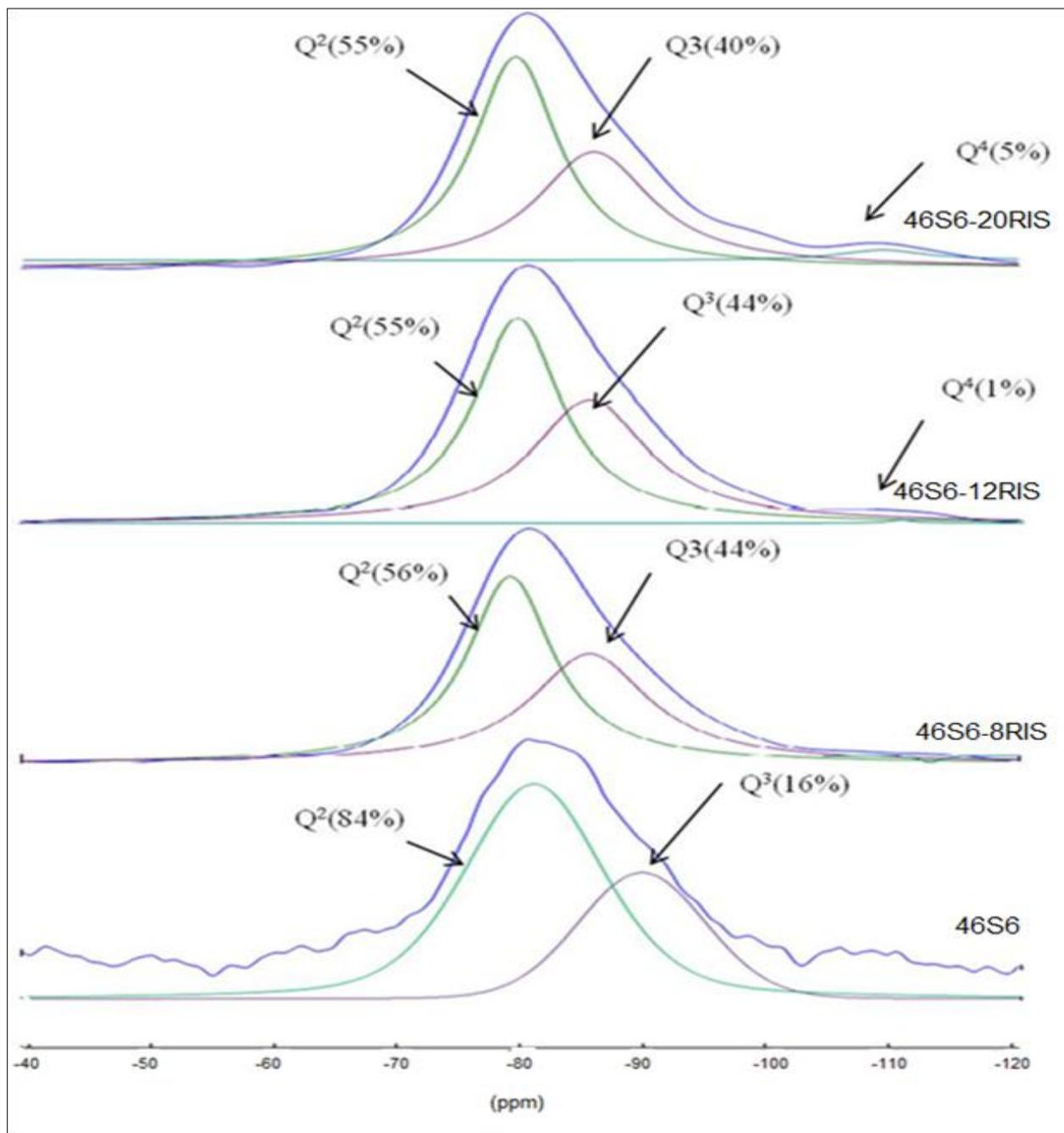


Figure 4A : Spectres MAS-RMN ^{29}Si du 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.

Table 1: Résultats de la déconvolution des spectres MAS-RMN ^{29}Si de 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.

Composites	Espèces					
	Q^2		Q^3		Q^4	
	ppm	%	ppm	%	ppm	%
46S6	-80	84	-86	16	0	0
46S6-8RIS	-79	56	-85	44	0	0
46S6-12RIS	-79	55	-85	44	-109	1
46S6-20RIS	-79	55	-85	40	-109	4

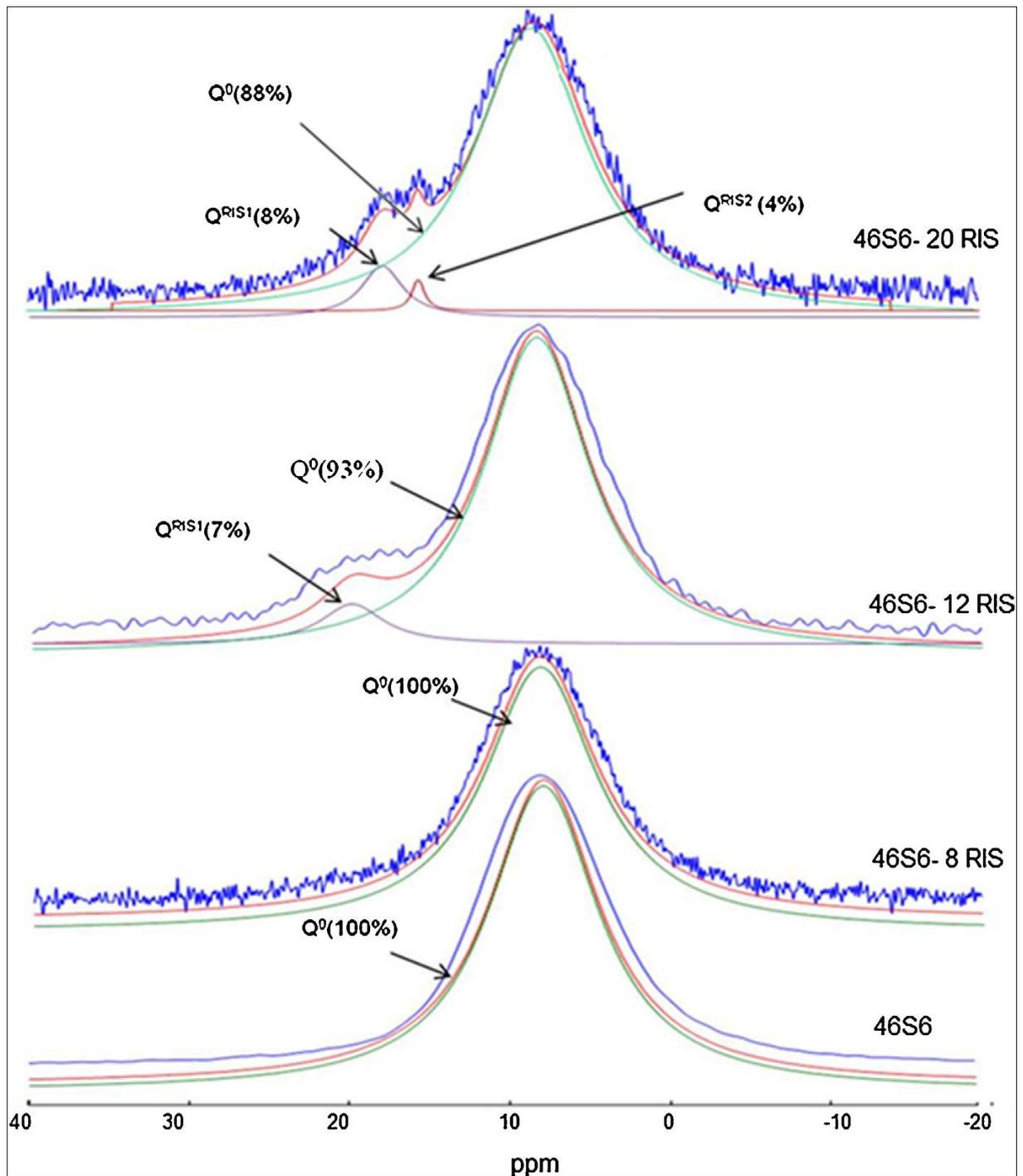


Figure 4B : Spectres MAS-RMN ^{31}P du 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.

Table 2 : Résultats de la déconvolution des spectres MAS-RMN ³¹P de 46S6 et des composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.

Composites	Espèces					
	Q ⁰		Q ^{RIS1}		Q ^{RIS2}	
	ppm	%	Ppm	%	ppm	%
46S6	7	100	0	0	0	0
46S6-8RIS	8	100	0	0	0	0
46S6-12RIS	8	93	19	7	0	0
46S6-20RIS	8	88	18	8	15	4

II-5- Spectrométrie par diffusion Raman

Le spectre de diffusion RAMAN du verre bioactif pur montre la présence des bandes larges de Si-O-Si observées à des longueurs d'ondes de 605 et 947 cm⁻¹. Le spectre RAMAN du composite 46S6-8RIS montre la présence de seulement des bandes caractéristiques du verre bioactif et ceci peut être expliqué par la faible quantité de risédronate utilisée lors de l'association du composite 46S6-8RIS. Tandis que dans le cas du composite 46S6-20RIS nous remarquons la présence de 4 bandes de C-C respectivement observées à des longueurs d'ondes de 249, 286, 401 et 418 cm⁻¹. Nous notons aussi la présence des bandes de C-P à des longueurs 612 et 814 cm⁻¹ et finalement nous observons la présence des bandes de P-OH

observées à des longueurs d'ondes 849 et 872 cm^{-1} . Ce résultat illustre bien la fixation du risédronate avec le 46S6 (Figure 5).

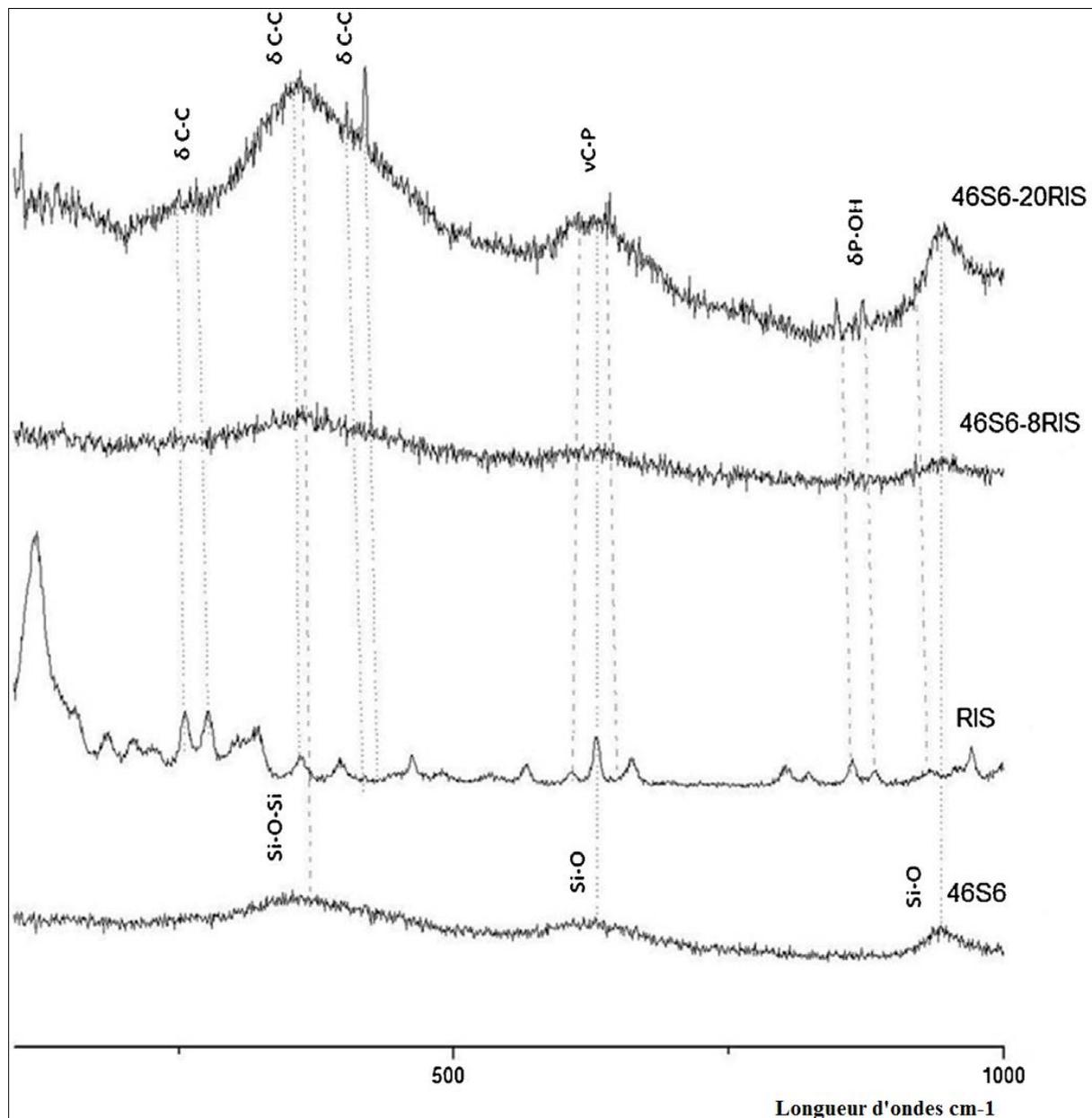


Figure 5: Spectre RAMAN des composites 46S6-xRIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80).

II-6-Cinétique de libération du silicium dans le KCl après incubation des compositions 46S6-xRIS

Après l'incubation des composites 46S6-xRIS dans le KCl, nous remarquons la diminution du relargage de silicium avec le temps. Ce dernier se stabilise après 40 min chez les composites 46S6-xRIS. Ce résultat nous amène à penser que le risédronate occupe le maximum des sites correspondants au silicium. Nous concluons alors que le seuil d'adsorption du risédronate par le 46S6 est atteint après 40 min d'incubation.

Ces résultats nous amène à penser que plus la quantité de risédronate est importante, plus la quantité du silicium libérée dans la KCl est importante. Aussi, nous remarquons que le seuil d'adsorption est proportionnel avec la quantité de risédronate ajoutée (Figure 6).

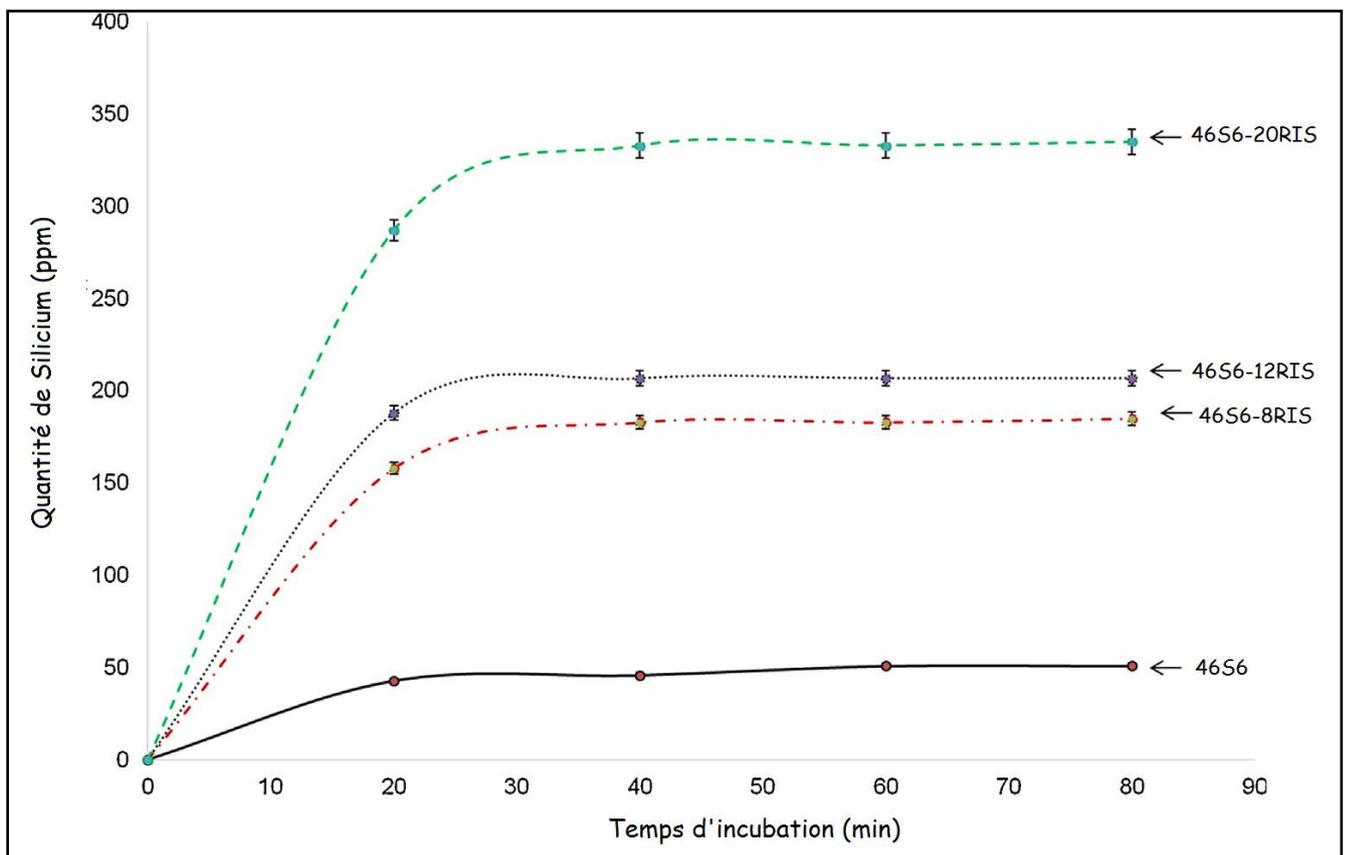


Figure 6 : Cinétique du relargage de silicium des composites 46S6-xRIS après différents délais d'incubation dans le KCl (20, 40, 60 et 80).

II-7 – Etude de la cinétique d'échange du risédronate avec le KCl lors d'incubation des composites 46S6-xRIS

La molécule de risédronate monosodique présente un maximum d'absorption ($\lambda_{\max} = 262 \text{ nm}$) dans le domaine UV-Visible (Figure 7). Cette Longueur d'onde correspond au maximum d'absorbance du groupement aromatique (pyridine) présent dans la molécule. La concentration en risédronate est déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert. Le coefficient d'extinction molaire du risédronate (ϵ) est de $3,77 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ rapportée par la littérature [Vallano *et al*, 2003].

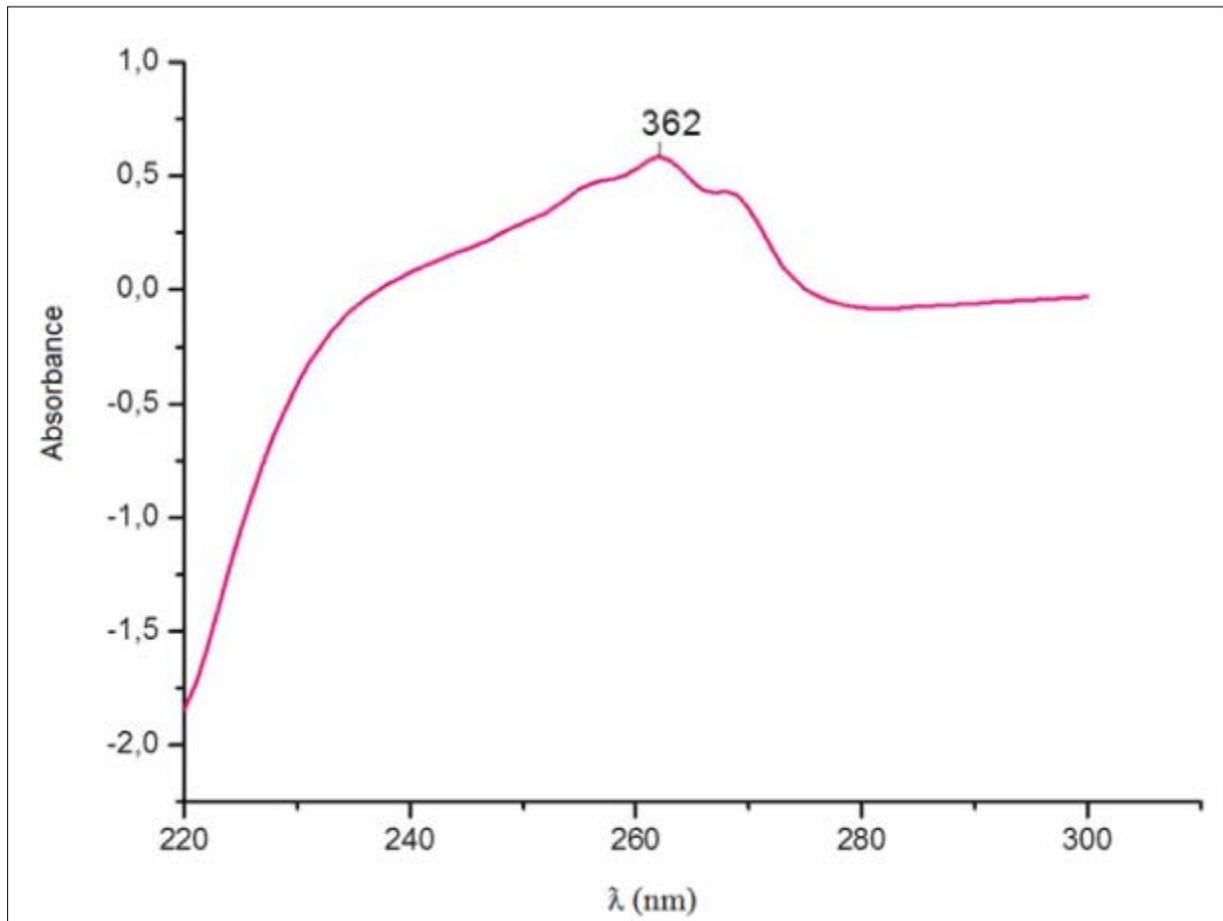


Figure 7: Spectre UV-Visible du risédronate monosodique 0,2 mM dans un milieu KCl 1mM à pH =7,4 et à 25°C.

La cinétique de relargage du risédronate dans le KCl au cours de l'association du risédronate avec le verre bioactif a été étudiée par UV-visible. En effet nous remarquons que la relargage de cette molécule atteint son seuil pour les composites 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS après 40 min d'incubation. Ce résultat montre que le maximum de fixation de risédronate sur le 46S6 est obtenu après 40 min (Figure 8).

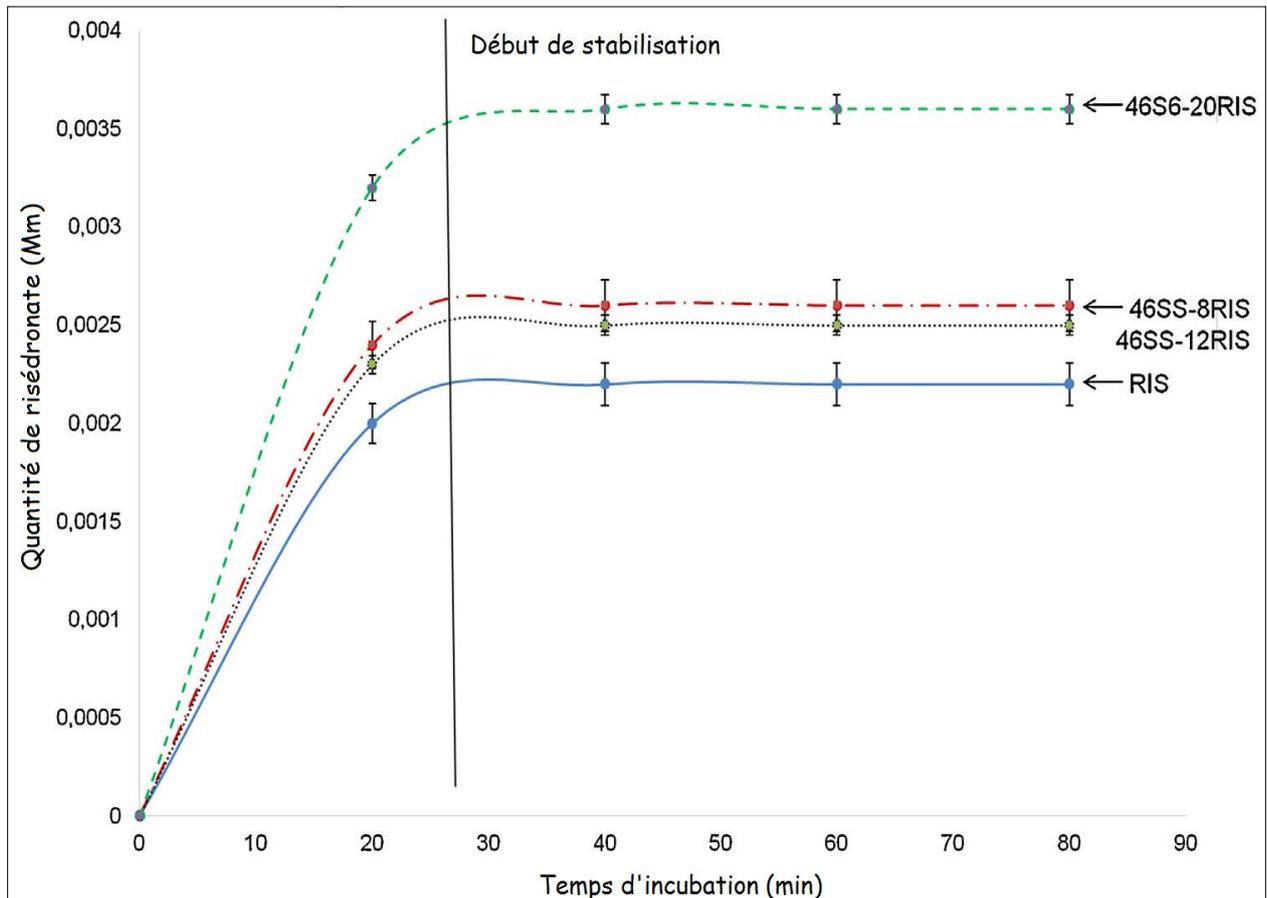


Figure 8: Spectre UV-Visible de la cinétique du relargage du risédronate et des composites 46S6-xRIS (X=8, 12 et 20 %) avec le milieu d'incubation (KCl) après différents délais d'incubation (20, 40, 60 et 80 min).

III-Discussion

L'étude menée par les différentes techniques physico-chimiques montre d'une manière générale que la réaction en solution du verre bioactif pure avec les molécules de risédronate à

différents pourcentages (8, 12, 20%) donne lieu à la formation de 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et 46S6-20RIS.

Bien que l'analyse par DRX des poudres issues des expériences d'association ne révèle aucune phase étrangère autre que celles caractéristiques d'une matrice vitreuse du verre bioactif. Les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge montrent la présence de risédronate à la surface du verre bioactif pur. Ainsi, nous avons noté sur les spectres infrarouges de verre bioactif obtenu après adsorption deux bandes de vibration supplémentaires de faibles intensités, attribuables aux modes de vibration des liaisons C-P de risédronate. Des observations similaires [Errassifi *et al*, 2011] ont été notées sur les spectres infrarouges d'une hydroxyapatite synthétisée en présence de risédronate. Ce résultat est expliqué par la structure amorphe du verre bioactif ce qui facilite la fixation avec d'autres molécules [Hench *et al*, 1994]. Cette étude est en accord avec les résultats rapportés par [Bui *et al*, 2010], illustrant ainsi la présence des bandes caractéristiques de zélodronate à la surface de 46S6 après l'association, ceci révèle la réactivité de la surface du verre bioactif et sa capacité à se lier avec d'autres molécules.

L'examen des spectres de diffusion Raman des échantillons obtenus après contact avec les solutions des bisphosphonates confirme la fixation de ces espèces à la surface de 46S6. En effet, on note l'apparition des bandes caractéristiques de la molécule de risédronate et spécialement les bandes de vibration relatives aux groupements C-C, P-C et P-OH. La position de ces bandes supplémentaires est déplacée par rapport à celle de la molécule libre (non liée au verre bioactif), traduisant l'existence d'interaction notable entre l'adsorbat et les sites actifs de la surface du verre bioactif.

L'examen des spectres RMN du phosphore (^{31}P MAS-RMN) de 46S6-12RIS obtenu après contact avec les solutions d'adsorption montre en plus d'un pic spécifique à la matrice du verre bioactif (8 ppm), un massif large situé vers 19 ppm attribué au phosphore des groupements fonctionnels du risédronate. Cette raie est large et de très faible intensité comparée aux deux pics fins et bien résolus (19 et 17 ppm) enregistrés sur le spectre de la molécule avant adsorption. Des résultats similaires ont été rapportés pour l'interaction des molécules de zolédronate avec des apatites phosphocalciques déficientes en calcium [Roussière *et al*, 2005].

Le spectre RMN du phosphore (^{31}P MAS-RMN) des 46S6-20RIS obtenu après contact avec les solutions d'adsorption révèle en plus du pic spécifique à la matrice du verre bioactif (8 ppm), la présence de deux pics (15, 18 ppm) caractéristiques du risédronate, ce qui illustre

d'une part l'augmentation de la fixation du risédronate sur la surface du verre bioactif en fonction de leurs concentrations et d'autre part le déplacement chimique des pics du risédronates est expliqué par la présence des liaisons chimiques entre le 46S6 et les risédronates. Ce résultat est en accord avec les résultats rapportés par [Oudadesse *et al*, 2013] lors de l'association des molécules de chitosane avec le 46S6.

Le RMN du phosphore (^{31}P MAS-RMN) des composites 46S6-12RIS et 46S6-20RIS obtenus après contact avec les solutions d'adsorption montre en plus du pic spécifique de la matrice du verre bioactif (8 ppm) la présence des pics caractéristiques du risédronate. Nous pouvons ainsi conclure que la fixation des molécules de risédronate à la surface de 46S6 induit des changements notables de l'environnement électronique des noyaux de phosphore des groupements ortho phosphates de la molécule étudiée.

Le spectre RMN du silicium (^{29}Si MAS- RMN) de 46S6-12RIS et 46S6-20RIS révèle le développement et l'émergence d'une autre espèce avec un déplacement chimique de -109 ppm correspondant ainsi à l'espèce Q^4 . L'apparition de cette espèce correspond à la perturbation de la matrice vitreuse du verre bioactif. Cette perturbation est le résultat des liaisons chimiques entre le 46S6 et le risédronate. L'apparition de cette espèce Q^4 dans le réseau vitreux, témoigne la dissolution de ce dernier et la formation d'une couche riche en SiO_2 . Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés par Dietrich *et al* [Dietrich *et al*, 2008].

La microscopie électronique à balayage montre la formation d'une couche de risédronate à la surface du 46S6, ce qui révèle la fixation de risédronate à la surface de 46S6. Ce résultat est en accord avec le résultat rapporté par Bui *et al* lors de l'association du zélodronate avec le 46S6 et le chitosane avec le 46S6. Le même résultat coïncide avec celui rapporté par Errassifi lors de l'association du risédronate avec des précipités de calcium. Cependant Cukrowski *et al* [Cukrowski *et al*, 2007] affirment sur la base des résultats issus de la combinaison de différentes techniques (Raman, RMN, DRX et MEB) la formation de complexes à la surface de l'hydroxyapatite et de l'os bovin traités par des solutions d'étidronate. La formation d'un précipité cristallin à la surface de l'hydroxyapatite et de l'os de rat a également été rapportée dans l'étude menée par Raman et MEB [Juillard *et al*, 2010] sur la réactivité de ces matériaux avec le zolédronate. La précipitation de telles phases a aussi été observée par RMN du solide et MEB lors d'interaction de zolédronate et de tiludronate avec des phosphates tricalciques β [Josse, 2003; Roussière *et al*, 2005].

Des analyses physico-chimiques ont été réalisées par ICP-EOS sur le surnageant après la centrifugation, montre l'occupation des sites de silicium par le risédronate, révélant ainsi la perturbation de la matrice vitreuse et la destruction des liaisons chimiques du verre bioactif. Ceci est en accord avec les résultats rapportés par la RMN. La fixation du risédronate sur le biomatériau entraîne la perturbation de sa matrice vitreuse, en effet l'association du risédronate avec l'HA occupe les sites du risédronate [Errassifi *et al*, 2011]. La saturation d'adsorption est observée pour le verre bioactif après 40 min. Alors que pour les apatites il est observé après 20 min [Errassifi *et al*, 2011]. La saturation est observée rapidement pour les faibles concentrations d'adsorbant. Des allures similaires ont été rapportées dans la littérature [Vitha *et al*, 2008] pour l'interaction de HA avec divers bisphosphonates (zolédronate, alendronate, ibandronate, étidronate, et clodronate). Par ailleurs, l'isotherme d'adsorption du zolédronate par HA à 37°C dans une gamme de concentration relativement élevée (10 à 50 mM) montre aussi un plateau de saturation bien défini, caractéristique d'une allure de type Langmuir, tandis que les auteurs [Josse *et al*, 2005] l'attribuent à la loi de Freundlich.

La cinétique d'adsorption du risédronate déterminée par UV montre aussi que la saturation d'adsorption est atteinte après 40 min. Aussi l'indice de saturation est obtenu plus rapidement pour les faibles quantités de risédronate associées au 46S6. Plus que la quantité de ce dernier est faible, plus que les processus d'adsorption sont rapides, ceci coïncide bien avec les résultats rapportés par Barroug et al 2000 [Barroug *et al*, 2000].

IV-Conclusion

La réactivité des verres bioactifs vis-à-vis du risédronate monosodique en milieu aqueux a été étudiée. L'adsorption de la molécule du risédronate est un processus rapide. Cela est vraisemblablement dû à la grande affinité de ces molécules pour la surface des composites 46S6-xRIS étudiées. Les paramètres caractéristiques de l'adsorption dépendent étroitement des propriétés de surface du solide. Le processus d'adsorption du risédronate semble être gouverné par un phénomène d'échange ionique impliquant les ions silicium de la surface des verres bioactifs étudiés.

La capacité de rétention des solides 46S6 diminue avec la durée de maturation. Cette évolution est associée à l'appauvrissement de la couche hydratée en ions labiles après maturation. Ces environnements instables à la surface des 46S6 constituent des sites privilégiés pour l'adsorption des molécules d'adsorbat.

Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-chimique des verres bioactifs associés au risédronate (46S6-xRIS)

L'étude comparée des propriétés d'adsorption des phosphates de calcium vis-à-vis du risédronate montre que la réactivité de 46S6 similaire au tissu osseux est plus importante que celle de l'hydroxyapatite, support de référence. La caractérisation des solides obtenus après adsorption permet de préciser la nature des molécules de risédronate fixées par le 46S6.

Les explorations *in vivo* doivent être précédés par une exploration *in vitro* sans cellules (Immersion dans le SBF), afin d'évaluer leur réactivité et bioactivité chimique, et avec cellules pour tester la cytotoxicité de biomatériaux pour éviter les risques des infections et de rejections au cours de l'implantation.

*Partie 2: Test in vitro sans cellules (Immersion dans
le SBF) des biomatériaux synthétisés*

I-Introduction

Pour tester la bioactivité et la réactivité chimique des composites 46S6-xRIS, nous avons eu recours à la réalisation des tests « *in vitro* » par l'immersion de 30 mg de poudre de ces composites dans 60 ml du liquide physiologique SBF (simulated body fluids).

II- Résultats

II-1-Exploration physico-chimique des composites 46S6-xRIS après expérimentation *in vitro* sans cellules

II-1-1-Etude de structure par diffraction des rayons X (DRX)

a-Après 1 jour d'immersion

Le diffractogramme des rayons X des composites 46S6-xRIS après 1 jour d'immersion dans le SBF est présenté dans la figure 1. Nous avons utilisé le diffractogramme DRX d'hydroxyapatite comme référence pour évaluer la formation de la couche d'apatite à la surface des biocomposites après expérimentation *in vitro*.

Après 1 jour d'immersion nous ne remarquons aucune raie caractérisant la formation de l'hydroxyapatite dans les diffractogrammes de 46S6 et des 46S6-xRIS (X= 8, 12 et 20).

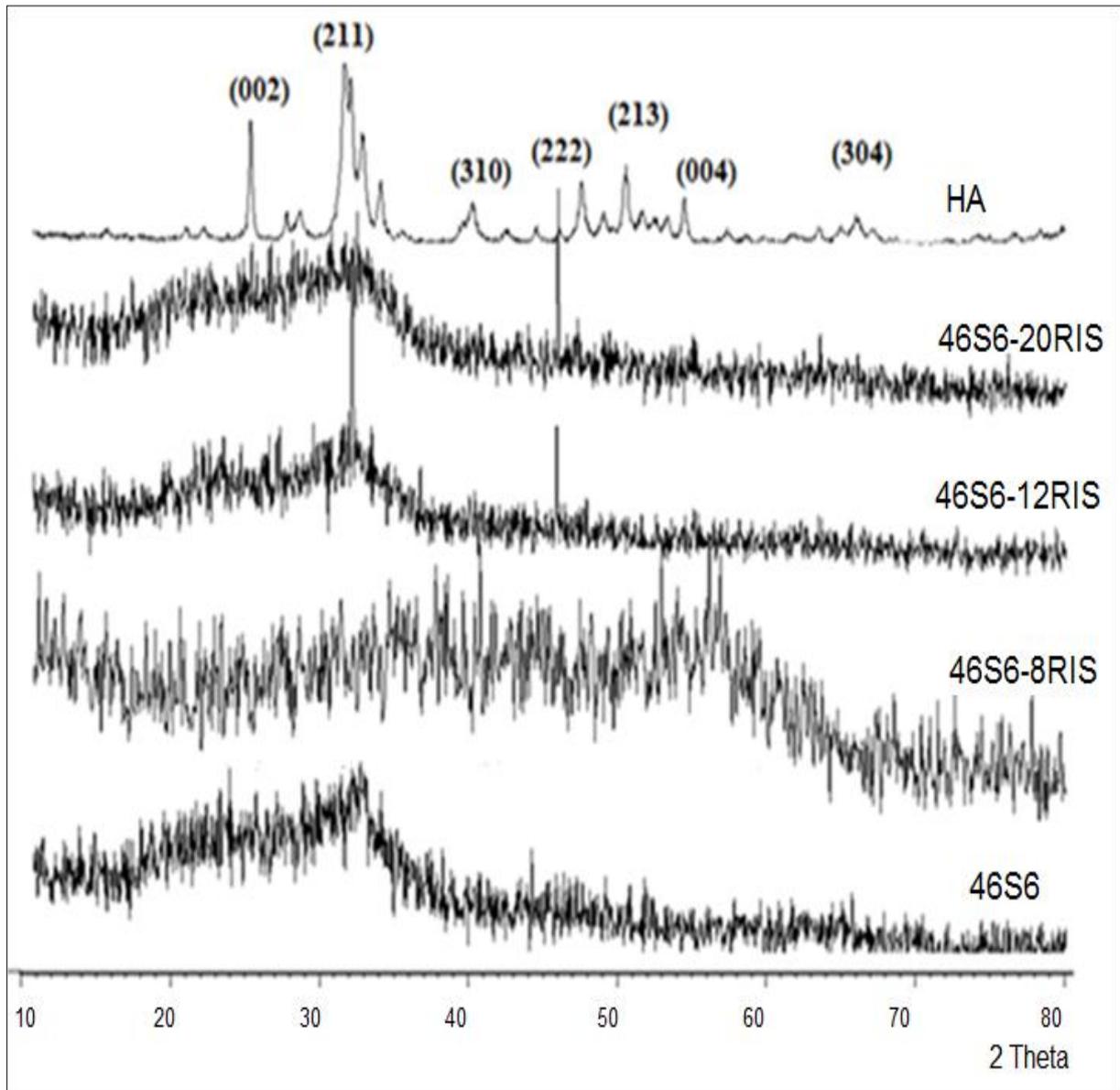


Figure 1 : Diffractogrammes des rayons X (DRX) de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (X= 8, 12 et 20) après 1 jour d’immersion dans le SBF.

c- Après 15 jours d’immersion dans le SBF

Après 15 jours d’immersion dans le liquide physiologique SBF, les diffractogrammes du 46S6 et du 46S6-8RIS (Figure 2) montrent la présence de toutes les raies caractéristiques des cristaux d’hydroxyapatites observées vers 26, 32, 40, 46, 50, 53 et 64 (2θ). Ces dernières correspondent respectivement aux plans de diffractions (002), (211), (310), (222), (213),

(004) et (304) du réseau hexagonal de l'apatite. Alors que les diffractogrammes du 46S6-12RIS et du 46S6-20RIS illustrent l'absence des raies caractéristiques de l'hydroxyapatite.

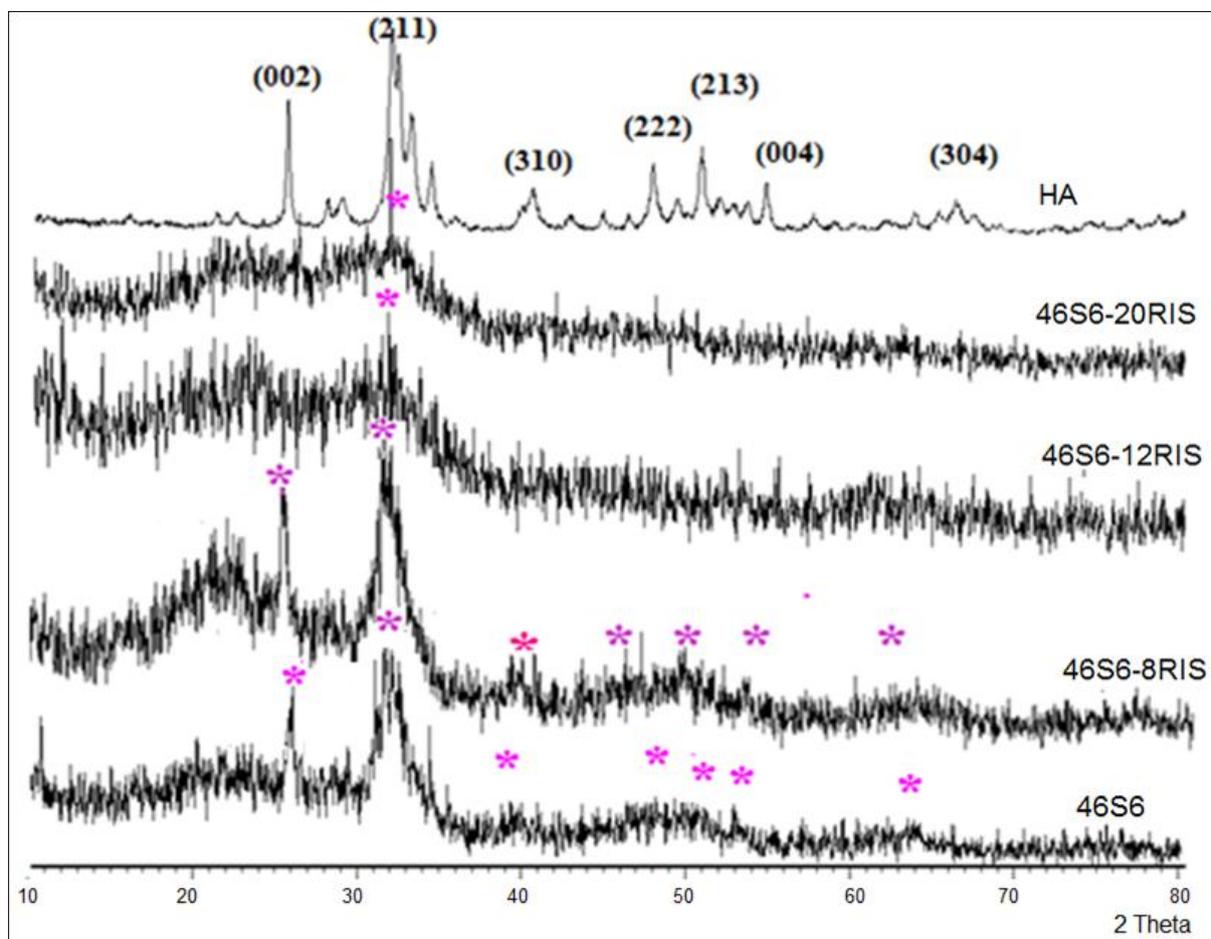


Figure 2 : Diffractogrammes (DRX) de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (X= 8, 12 et 20) après 15 jours d'immersion dans le SBF.

d- Après 30 jours d'immersion dans le SBF

Après 30 jours nous remarquons les mêmes résultats que ceux obtenus après 15 jours (Figure 3),

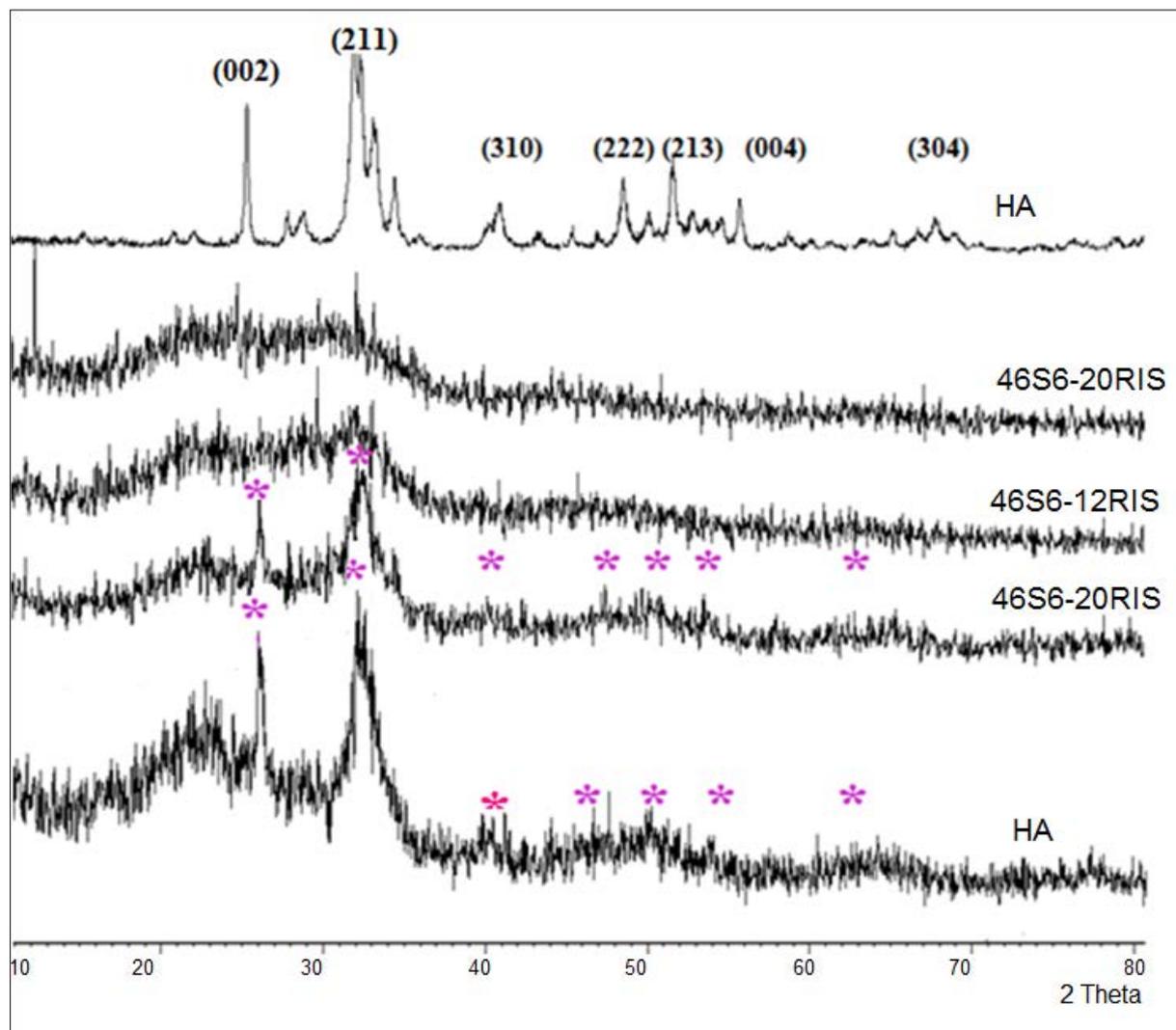


Figure 3 : Diffractogrammes (DRX) de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20) après 30 jours d'immersion dans le SBF.

II-1-2-Analyse par spectrométrie infrarouge (FTIR) des composés 46S6-xRIS après immersion dans le SBF

a-Après 1 jour d'immersion dans le SBF

Les spectres IR du verre pur et des composites (46S6-xRIS) montrent l'apparition des bandes caractéristiques de l'hydroxyapatite. Ces bandes sont attribuées aux groupements PO_4^{3-} observées vers des longueurs d'ondes de 874 et 1039 cm^{-1} . Nous notons aussi l'apparition des bandes de carbonates observées vers 847 et 1420 cm^{-1} (Figure 4 et Tableau 1).

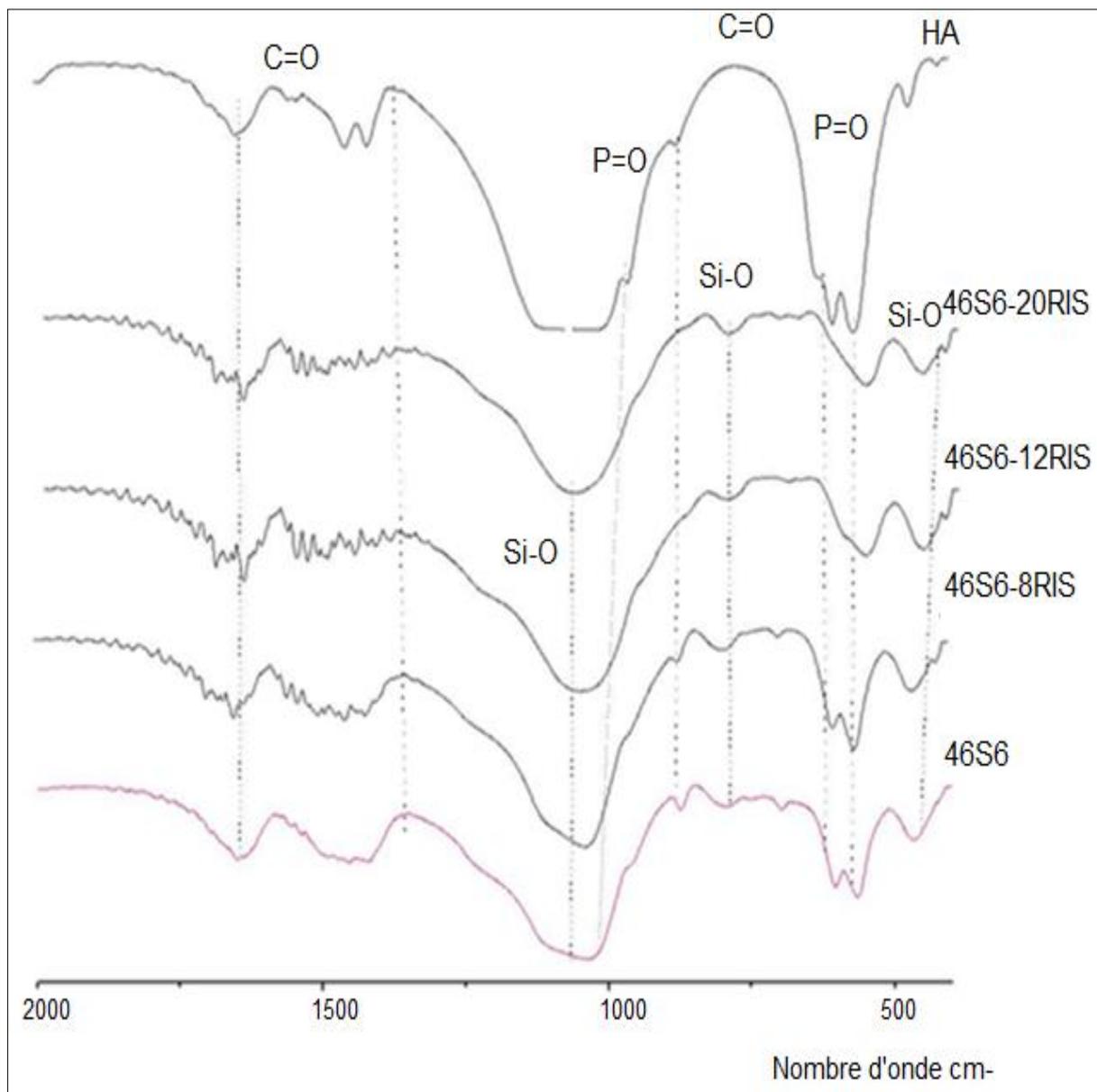


Figure 4: Spectres IR de la surface 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20) après 1 jour d'immersion dans Le SBF

Tableau 1 : Représente les longueurs d'ondes des bandes situées à la surface du verre pur et des composites 46S6-xRIS après 1 jour d'immersion dans le SBF

Groupements Composite	PO ₄ ³⁻	CO ₃ ²⁻	Si-O-Si
46S6	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-8RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-12RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-20RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹

b-Après 15 jours d'immersion dans le SBF

Les spectres IR de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12, 20%) montrent l'apparition des bandes caractéristiques de l'hydroxyapatite. Nous observons ainsi l'apparition d'une nouvelle bande de PO₄³⁻ à une longueur d'onde de 565 cm⁻¹ avec la persistance et l'augmentation des intensités des autres bandes situées à 874 et 1039 cm⁻¹. Nous observons aussi l'existence et l'augmentation des bandes des carbonates situées à 847 et 1420 cm⁻¹ (Figure 5 et Tableau 2).

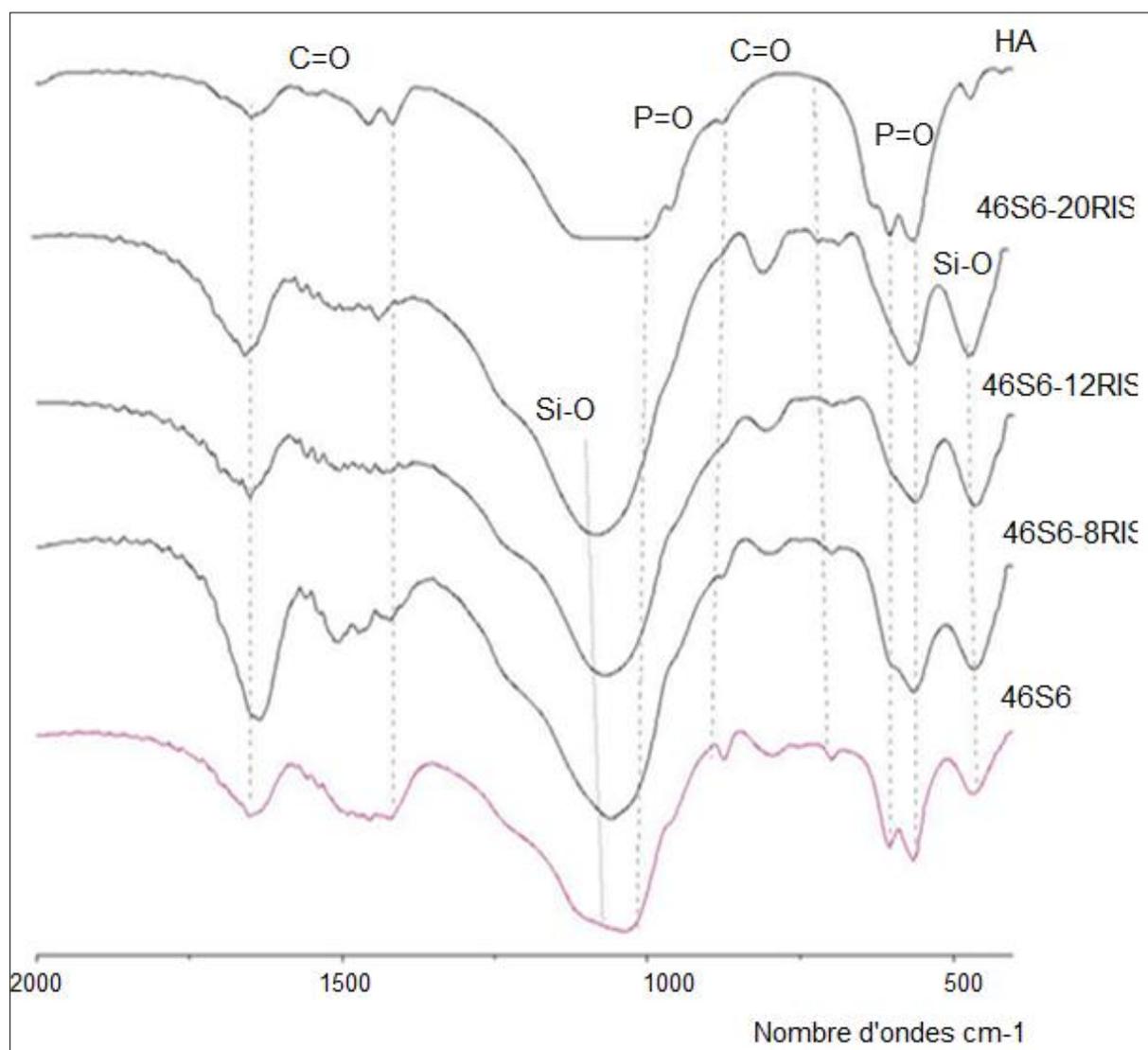


Figure 5: Spectres IR de la surface de 46S6 et des composites 46S6-xRIS ($x= 8, 12$ et 20) après 15 jours d'immersion dans Le SBF.

Tableau 2 : Représente les longueurs d'ondes des bandes situées à la surface du verre pur et des composites 46S6-xRIS après 15 jours d'immersion dans le SBF

Groupements Composite	PO ₄ ³⁻	CO ₃ ²⁻	Si-O-Si
46S6	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-8RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-12RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-20RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹

c- Après 30 jours d'immersion dans le SBF

Les spectres IR de 46S6 et des composites (46S6-xRIS) montrent la présence et l'augmentation d'intensité de toutes les bandes caractéristiques de l'hydroxyapatite. Nous observons aussi l'augmentation des intensités des bandes PO₄³⁻ à des longueurs d'onde de 565 cm⁻¹, 874 et 1039 cm⁻¹. Nous signalons aussi l'augmentation d'intensité des bandes de carbonates situées à 847 et 1420 cm⁻¹. Pour le composite 46S6-8RIS, une structure similaire à celle de l'HA est mise en évidence. Ceci explique que la bioactivité de 46S6-xRIS est inversement proportionnelle à la quantité de RIS associée au 46S6 (Figure 6 et Tableau 3).

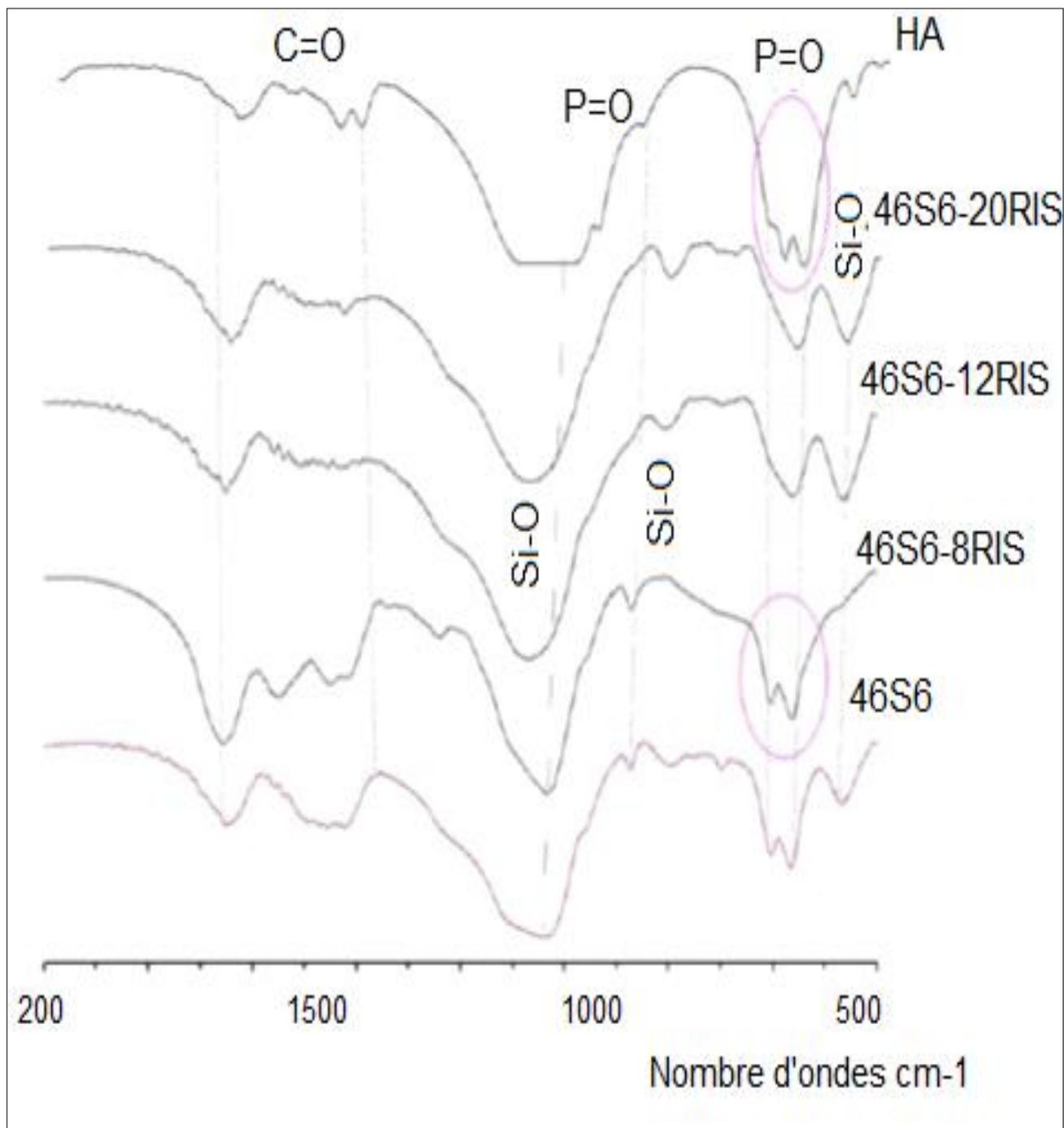


Figure 6: Spectres IR de la surface 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20) après 30 jours d'immersion dans Le SBF.

Tableau 3: Longueurs d'ondes des bandes situées à la surface du verre pur et des composites 46S6-xRIS après 30 jours d'immersion dans le SBF

Groupements Composite	PO ₄ ³⁻	CO ₃ ²⁻	Si-O-Si
46S6	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-8RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-12RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	470 cm ⁻¹ 799 cm ⁻¹ 1075 cm ⁻¹
46S6-20RIS	565 cm ⁻¹ 603 cm ⁻¹ 1039 cm ⁻¹	874 cm ⁻¹ 1428 cm ⁻¹	

II-1-3- Composition ionique du SBF après immersion des composés 46S6-xRIS après différents délais

Les solutions SBF ont été analysées par la spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) après chaque période d'immersion. Cette méthode offre une sensibilité élevée, autour de 1 ppm et une bonne précision. La faisabilité et la reproductibilité de cette technique ont été validées dans nos travaux précédents [Dietrich *et al*, 2008- Dietrich *et al*, 2009]. Cette technique a été utilisée pour mettre en relief les échanges ioniques entre la solution de SBF et la matrice vitreuse du verre bioactif 46S6 après immersion. La concentration de silicium (Si) (Figure 7), du calcium (Ca) (Figure 8) et de phosphore (P) (Figure 9) ont été mesurées pour chaque période d'immersion. En effet, le silicium est un indicateur de la dissolution du verre bioactif alors que le calcium et le phosphore nous aide à évaluer et comprendre la formation de la couche d'HA à la surface du verre 46S6 [Oudadesse *et al*, 2009- Dietrich *et al*, 2009].

La libération de silicium durant le premier jour est très rapide, il est de 0 à 50 ppm pour le 46S6 et de 0 à 41 ppm pour les composites 46S6-xRIS globalement. Cette libération d'ions de silicium indique la première étape de la dissolution du verre par la rupture des liaisons de silice de sa matrice vitreuse. Le silicium qui est dissous sous la forme d'acide mono silicaté $\text{Si}(\text{OH})_4$ dans la solution de SBF est le résultat de la rupture des liaisons chimiques $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ et la formation de $\text{Si}-\text{OH}$ (Silanols) à l'interface du verre bioactif et la solution de SBF. La présence du risédronate diminue ce phénomène et par conséquent la dissolution de la matrice vitreuse du verre bioactif 46S6. Aussi bien pour le produit de référence que pour les composite. Le maximum de silicium est libéré jusqu'à 15 jours, tout en passant par deux phases : une rapide (0-1jour) et une moins rapide (1-15 jours). Le 46S6 et le 46S6-8RIS qui contiennent le plus grand pourcentage de verre pur, libèrent plus de silicium dans la solution SBF. En effet, le verre pur (46S6) et en association avec 8% de RIS (46S6-8RIS) libèrent respectivement 64 et 63 ppm de silicium après 30 jours d'immersion. En effet, les grains des verres sont enrobés par les risédronate ceci explique la faible libération de silicium par rapport au 46S6 chez les composites 46S6-12RIS et 46S6-20RIS. Ce résultat prouve aussi que le réseau de silice 46S6 est dégradé progressivement dans la solution de SBF. Pour les ions calcium (Ca) et phosphore (P) les mêmes allures de libération ont été observées. En effet, les quantités de Ca et de P diminuent en fonction du temps entre 1 et 30 jours. Ceci signifie la consommation de Ca et de P par le verre bioactif. Ainsi plus la quantité de 46S6 est importantes dans les composites 46S6-xRIS plus la consommation de Ca et de P est forte. Inversement, plus la quantité de risédronate est importante plus la consommation du Ca et du P est faible. La diminution de la cinétique d'absorption du calcium et du phosphore par le composite 46S6-8RIS peut être témoignée par la cristallisation observée par la diffraction des rayons X (DRX). Sachant que l'intégration de verre bioactif dans le SBF avec sa haute bioactivité [Dietrich *et al*, 2008] favorise la consommation du calcium et de phosphore pour la création de l'hydroxyapatite.

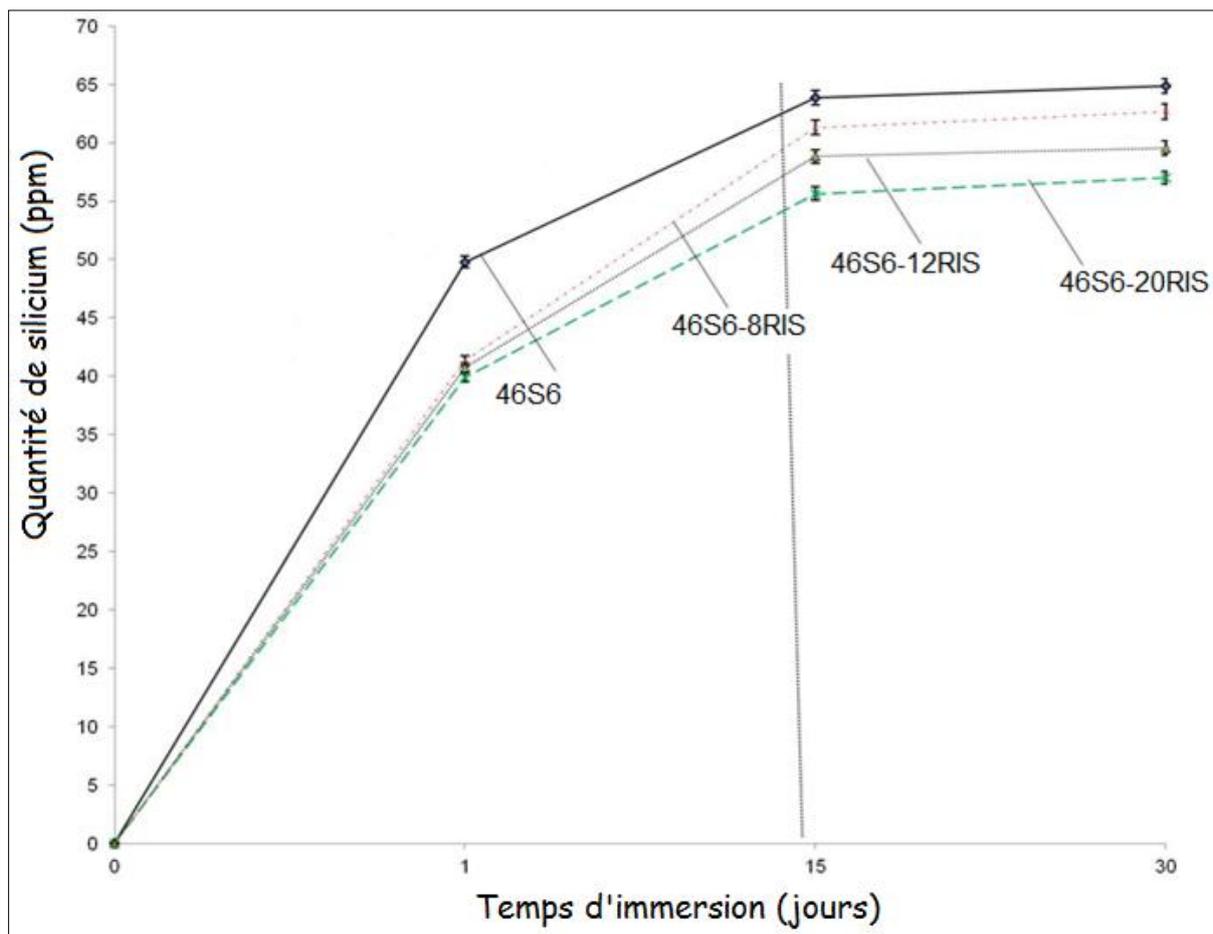


Figure 7: Concentration de silicium (Si) dans le SBF en fonction du temps d'immersion de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20)

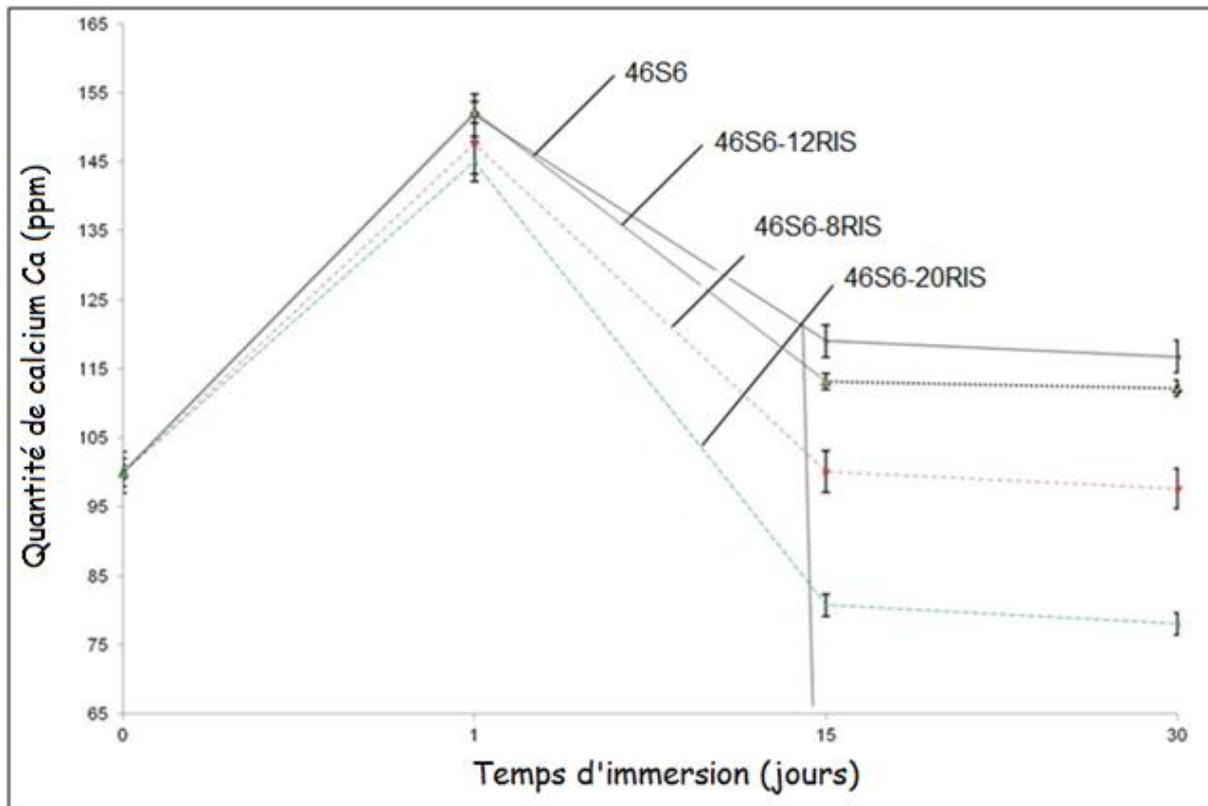


Figure 8: Concentration de calcium (Ca) dans le SBF en fonction du temps d'immersion de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20)

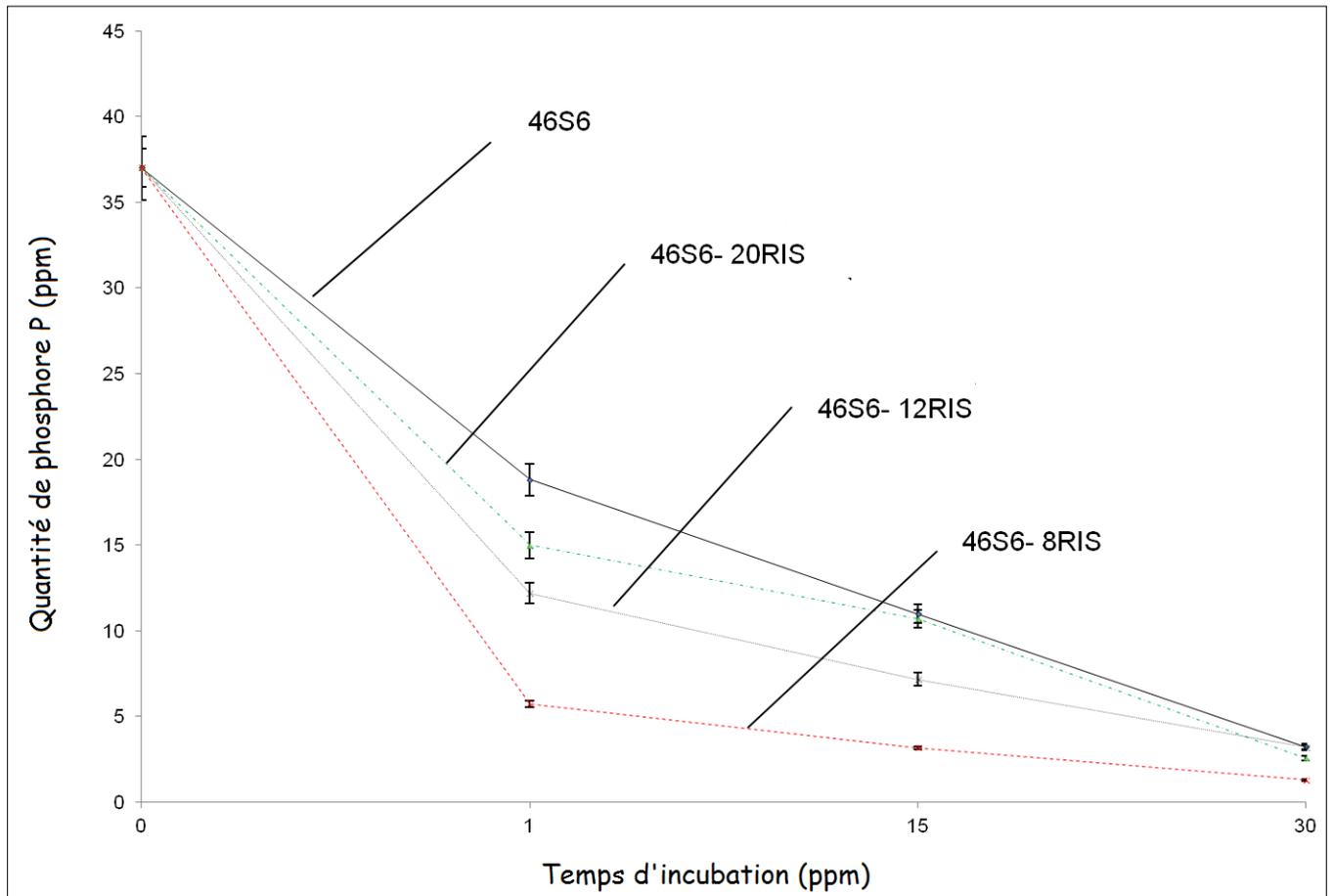


Figure 9: Concentration de phosphore (P) dans le SBF en fonction du temps d'immersion de 46S6 et des composites 46S6-xRIS (x= 8, 12 et 20)

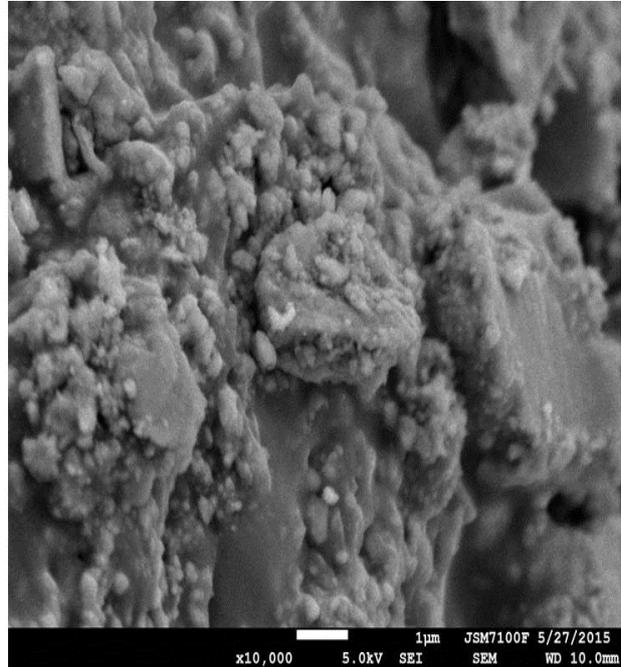
II-1-4- Analyse morphologique par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée avec la microanalyse – spectrométrie en énergie (EDS)

a-Après 1 jour d'immersion dans le SBF

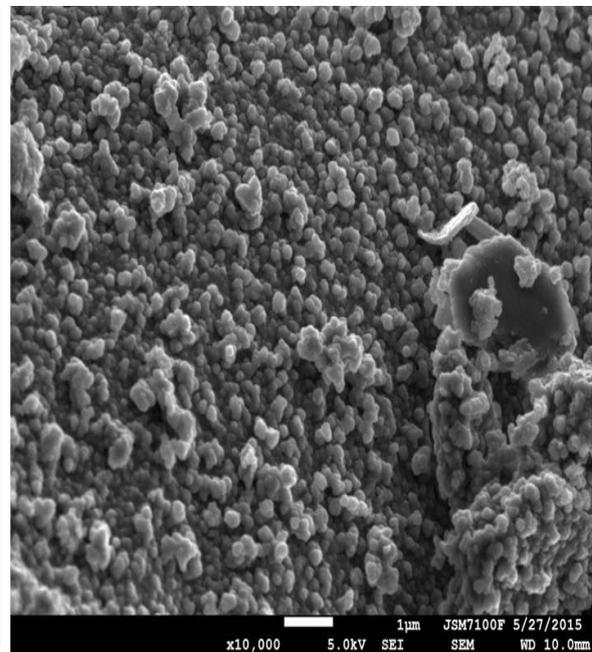
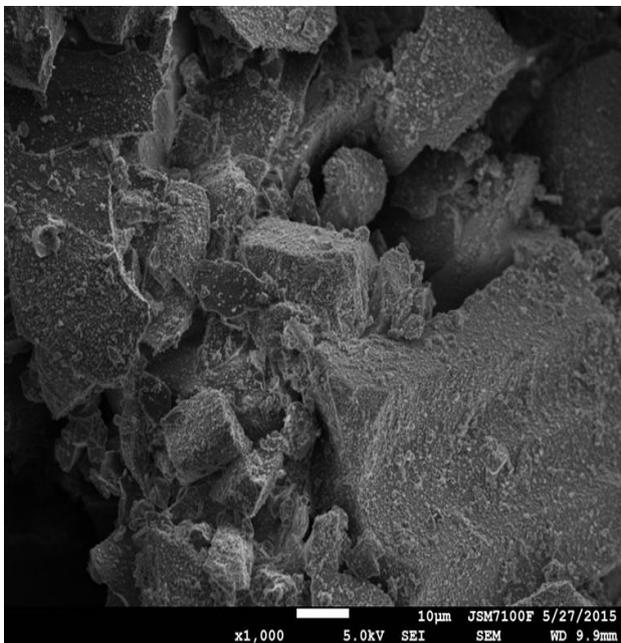
Les micrographies de la surface du verre 46S6-xRIS après 1 jour d'immersion est représentée sur la figure 10. Chaque micrographie a été faite au grossissement ($\times 1000$ et 10000) et réalisée après un 1 jour. Après 1 jour d'immersion, la surface de 46S6 et les surfaces de 46S6-xRIS (x=8, 12 et 20) présentent des couches constituées de particules sphériques compactées entre elles. On remarque également la présence des craquelures, mais à délai équivalent, ces dernières sont plus régulières et plus larges que celles observées en surface du 46S6. Comparativement aux spectres EDS obtenus pour le verre 46S6-xRIS, on

Partie 2 : Test in vitro sans cellules (Immersion dans le SBF) des biomatériaux synthétisés

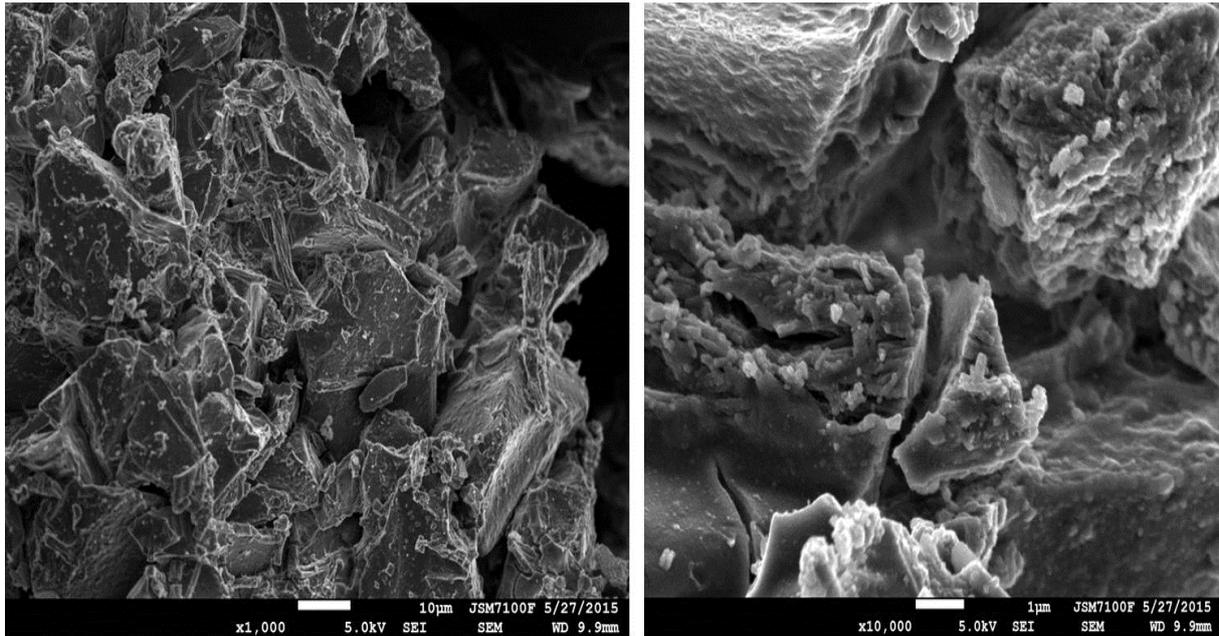
constate après un jour d'immersion une diminution des quantités de silicium présent en surface. En effet, à partir de 1 jour d'immersion, la quantité de silicium présent en surface décroît au profit de la quantité de calcium et de phosphore.



46S6-8RIS



46S6-12RIS



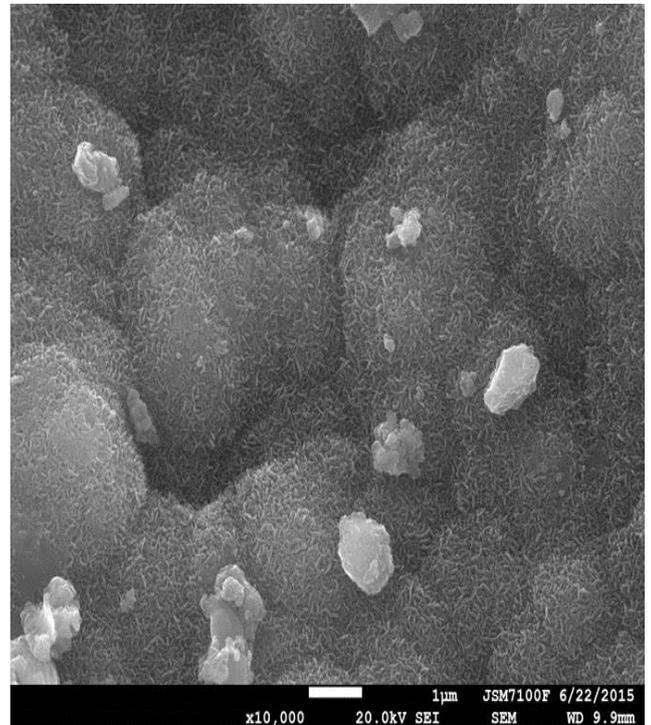
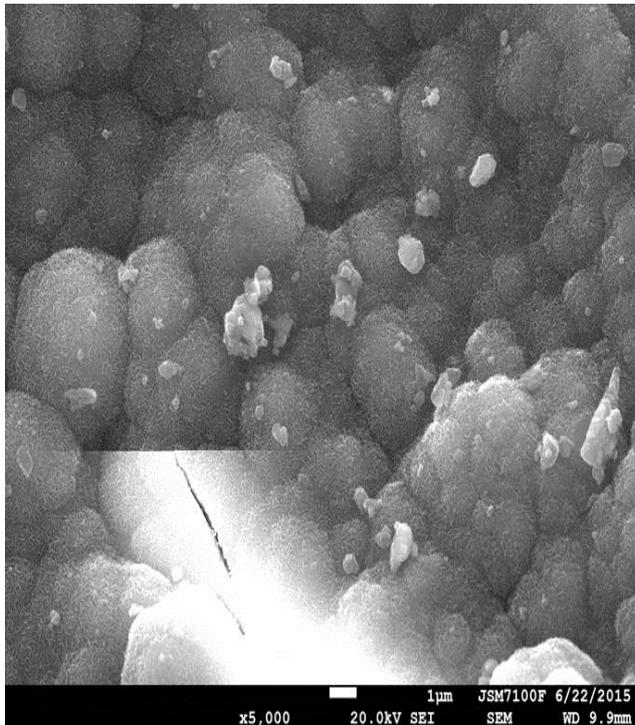
46S6-20RIS

Figure 10: Etudes morphologique des composites (46S6-0RIS, 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et du 46S6-20RIS) après 1 jour d’immersion dans le SBF.

b-Après 30 jours d’immersion dans le SBF

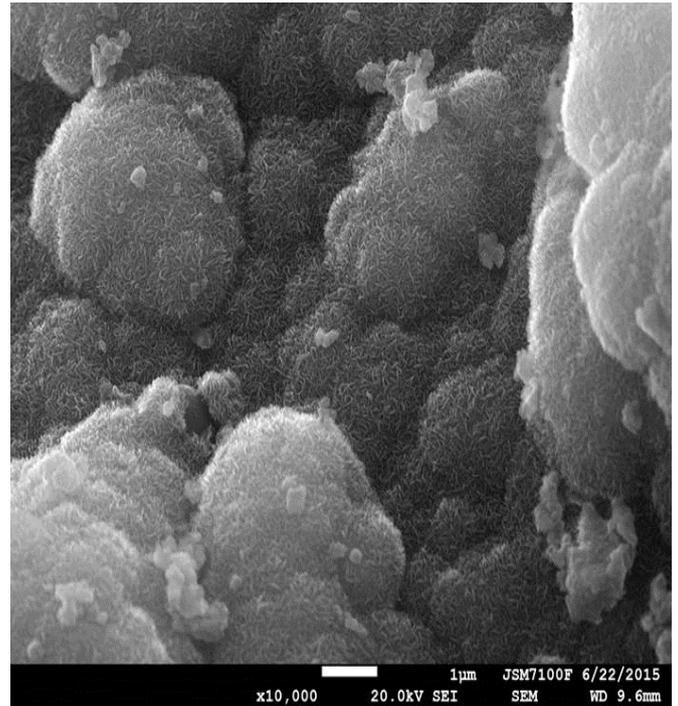
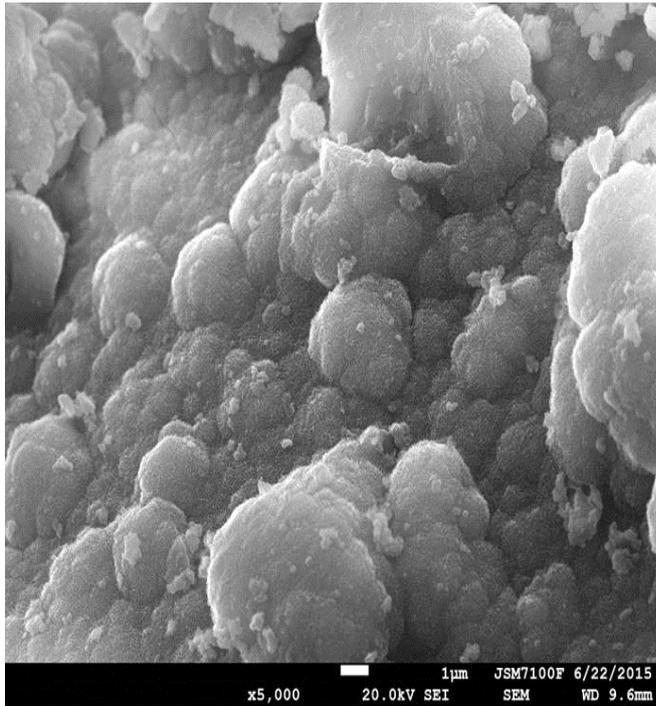
Les micrographies du verre bioactif 46S6 et des composites 46S6-xRIS après 30 jours d’immersion dans la solution SBF sont représentées par la Figure 11. Les surfaces du verre pur et du composite 46S6-8RIS sont couvertes par des particules homogènes. Ceci indique que le risédronate est libéré de la surface du composite 46S6-8RIS vers la solution SBF. On note aussi la formation d’une couche dense d’HA à la surface de 46S6-8RIS. En effet, la surface du composite verre-8RIS est recouverte par une couche d'apatite dense qui se compose de petits cristaux d'hydroxyapatite de forme identique. On constate que la couche d'hydroxyapatite formée sur la surface du composite 46S6-8 RIS est moins dense mais visible par rapport à celle observée à la surface du verre pure 46S6. Cependant, après 30 jours d’immersion de 46S6-12RIS et 46S6-20RIS dans le SBF, il n'y a pas de présence de particules qui indiquent la formation d’une couche HA. Ceci indique que l'utilisation de RIS avec une grande quantité atténue la bioactivité et la réactivité chimique des 46S6. Ce résultat coïncide avec les autres résultats signalés après l'association de diverses quantités de magnésium (de 0 à 12) avec le 46S6 et qui révèlent la diminution de la réactivité et la bioactivité chimique des composites 46S6-xMg avec l'augmentation des quantités de magnésium après 30 jours [Dietrich *et al*, 2008].

La cinétique de minéralisation et de formation de la couche d'HA à la surface du 46S6 et des composites 46S6-xRIS a été évaluée par l'évaluation du rapport phospho-calcique Ca/P pour chaque composite. En effet le rapport Ca/P nous fournit des informations sur la réactivité chimique des composites 46S6-xRIS et la cinétique de formation de la couche d'HA à la surface de 46S6-xRIS. Par conséquent, après 30 jours d'immersion, les rapports Ca / P à la surface de 46S6 et de 46S6-8RIS sont respectivement de 1,96 et 1,9. Cela indique la bonne formation et la bonne cristallisation de la couche d'HA à la surface du 46S6-8RIS et du 46S6. Alors que, à la surface de 46S6-12RIS et 46S6-20RIS, les rapports Ca / P sont respectivement autour de 1,57 et 1,51. Ainsi, ces valeurs montrent la présence et la formation de phosphate tricalcique à la surface de ces composites. Ces données mettent également en évidence la diminution de la formation et la cristallisation de la couche d'HA avec des quantités relativement grandes de RIS associés au verre pur 46S6 (Figure 12).

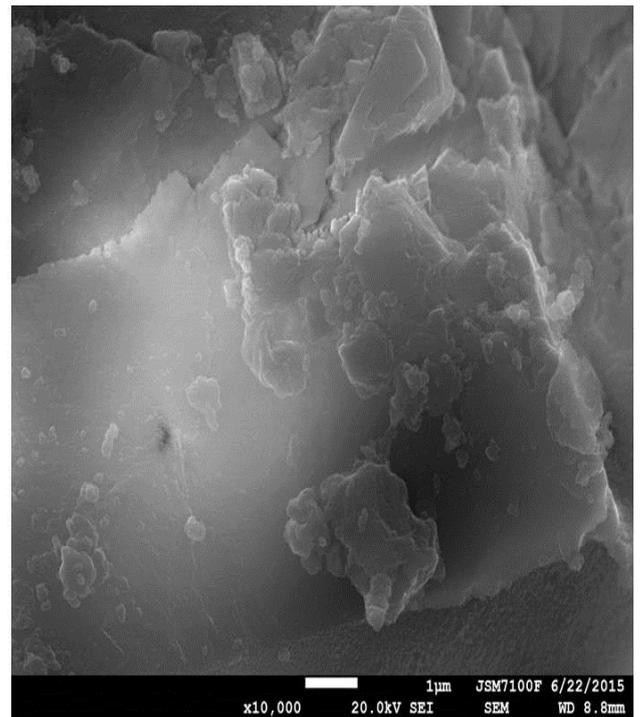
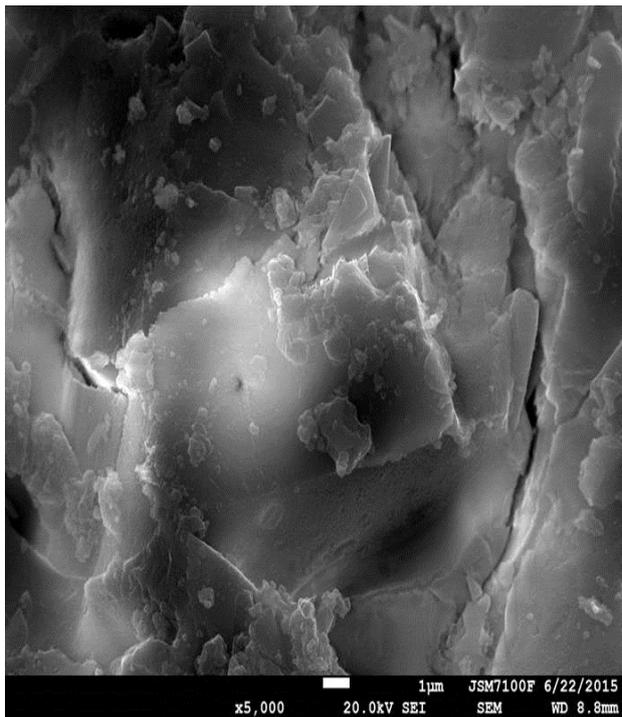


46S6

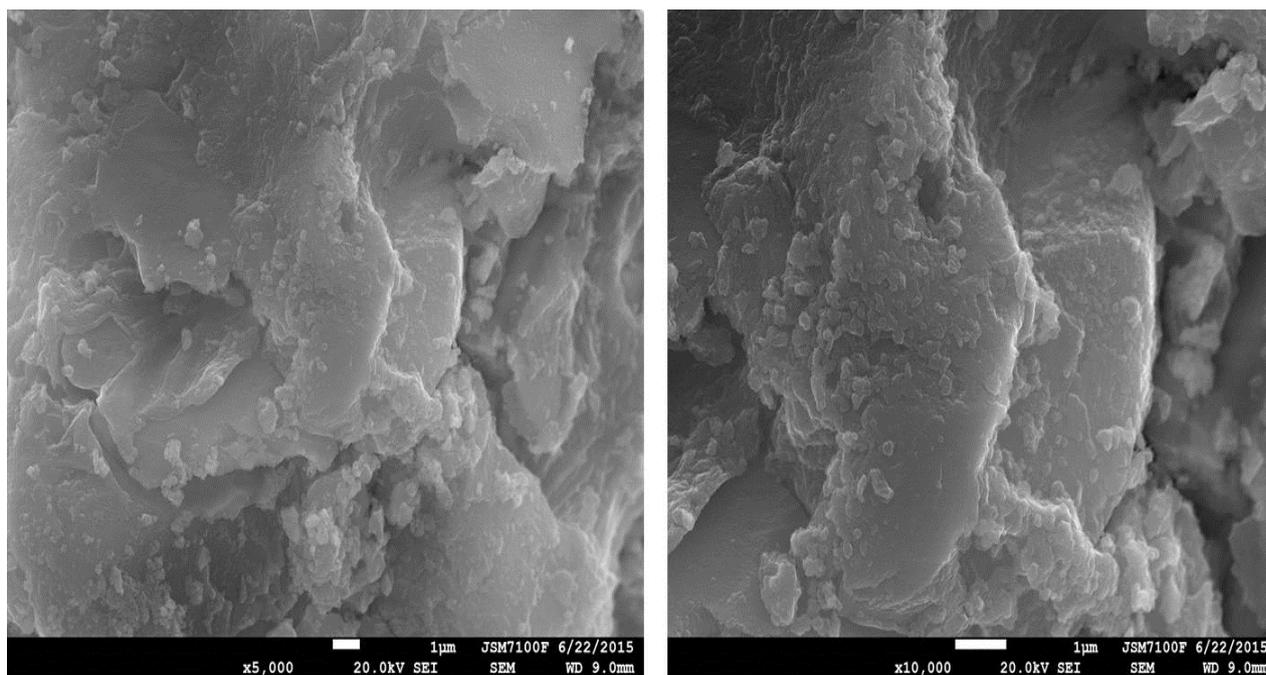
Partie 2 : Test in vitro sans cellules (Immersion dans le SBF) des biomatériaux synthétisés



46S6-8RIS



46S6-12RIS



46S6-20RIS

Figure 11 : Etudes morphologiques des composites (46S6, 46S6-8RIS, 46S6-12RIS et du 46S6-20RIS) après 30 jours d'immersion dans Le SBF.

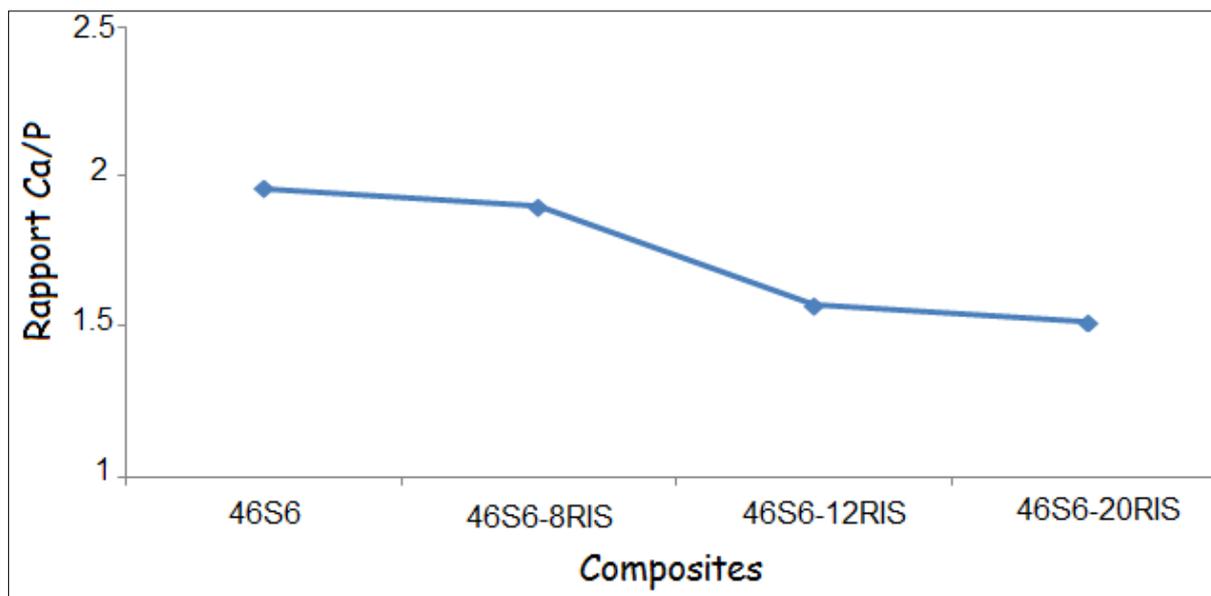


Figure 12 : Etudes par microanalyse – spectrométrie en énergie (EDS) des composites (46S6-8RIS, 46S6-12RIS et du 46S6-20RIS) après 30 jours d'immersion dans Le SBF.

II-1-5-Spectrométrie par diffusion Raman

Pour mieux vérifier les conclusions tirées à partir des résultats obtenus à travers les techniques DRX, FTIR, MEB-EDS et ICP-OES et qui ont montré que le RIS retarde le phénomène de réactivité chimique nous avons utilisé la technique RAMAN.

Le spectre Raman de 46S6-8RIS après 1 jour d'immersion ne montre aucune bande qui caractérise l'HA. Ce résultat illustre bien que la durée d'immersion de 1 jour est insuffisante pour la formation de l'HA à la surface de notre composite 46S6-8RIS (Figure 13). Après 30 jours, nous remarquons la présence de toutes les bandes caractérisant l'HA (Figure 14, Tableau 4). Les bandes qui apparaissent entre 400 et 500 cm^{-1} , entre 550 et 630 cm^{-1} et entre 1000 et 1090 cm^{-1} correspondent respectivement aux modes de vibration $\nu_2\text{PO}_4$, $\nu_4\text{PO}_4$ et $\nu_3\text{PO}_4$ des groupements phosphates apatitiques. Le pic intense à 960 cm^{-1} correspond au mode de vibration ν_1 des ions phosphates. Le spectre Raman de 46S6-20RIS après 1 et 30 jours d'immersion montre l'absence des bandes caractérisant l'HA, ce qui justifie la faible réactivité chimique de notre composite 46S6-20RIS. Ce résultat démontre aussi que la bioactivité des composite 46S6-xRIS est inversement proportionnelle à la quantité du risédronate associée au verre bioactif.

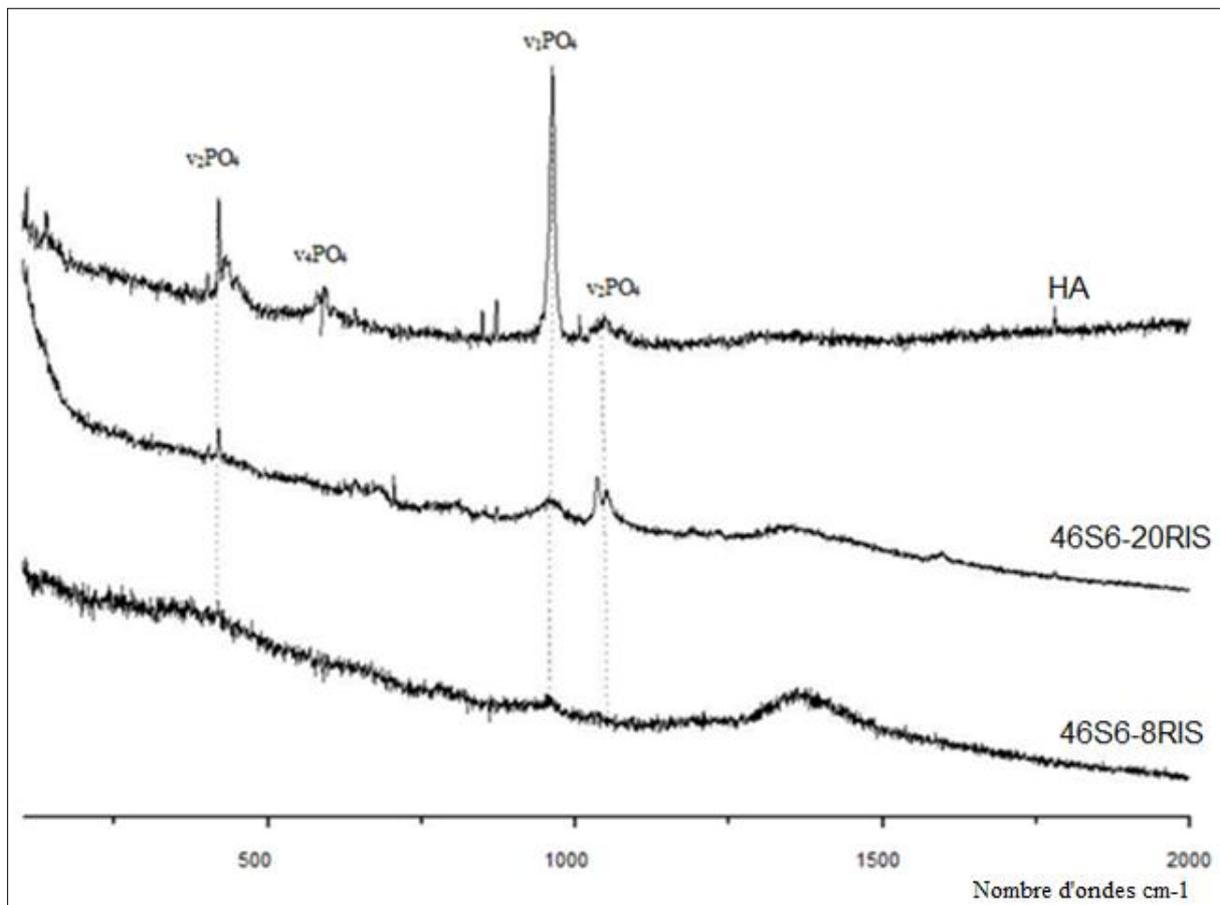


Figure 13 : Spectres RAMAN du composite 46S6-8RIS avant et après 1 et 30 jours d'immersion dans le SBF

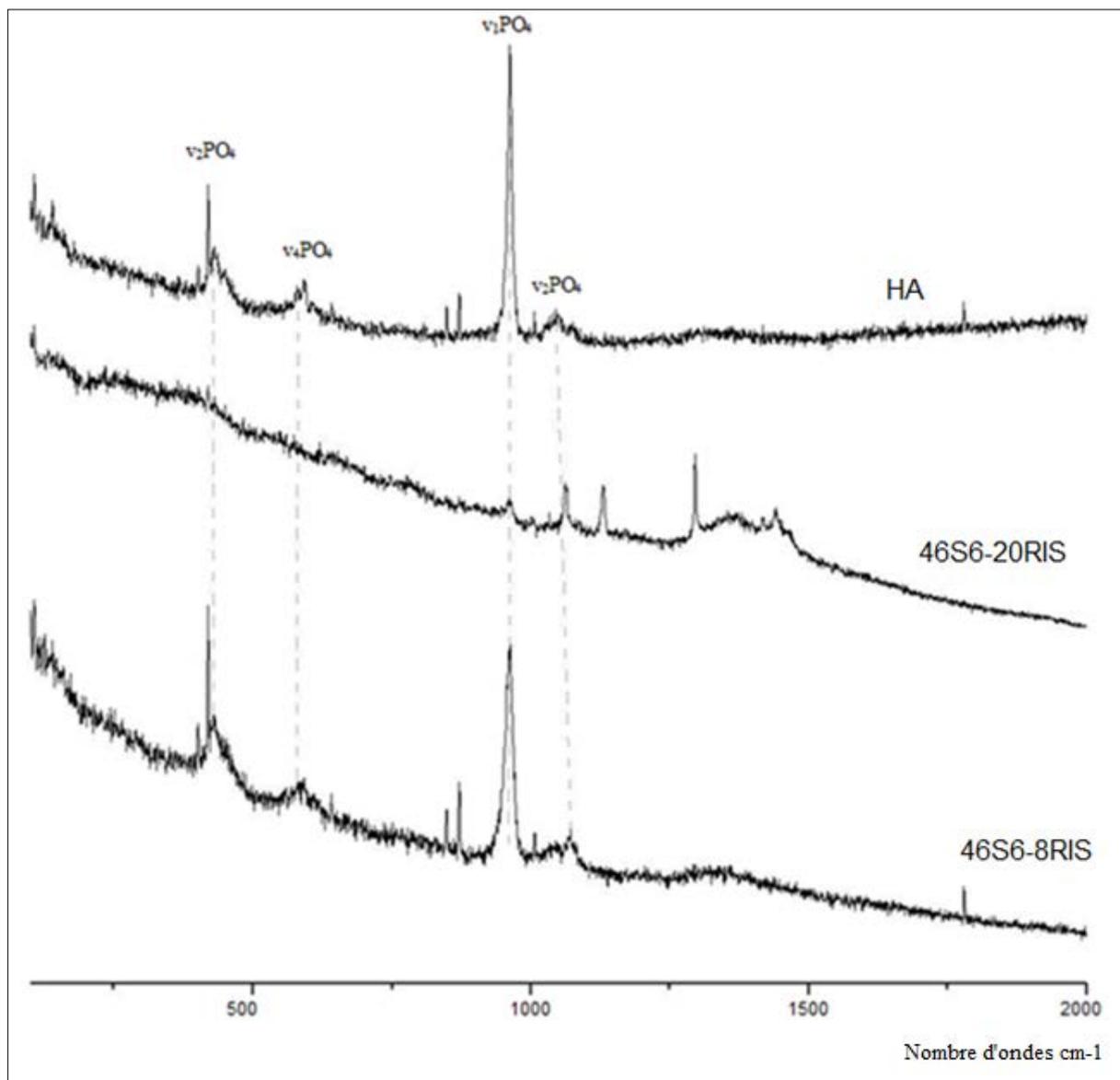


Figure 14 : Spectres RAMAN du composite 46S6-20RIS avant et après 1 et 30 jours d'immersion dans le SBF

Tableau 4: Modes de vibration des groupements PO_4^{3-} présents dans les composites 46S6 et 46S6-8RIS après 30 jours d'immersion dans le SBF.

Mode vibrationnelle des groupements PO_4^{3-}	ν_1	ν_2	ν_3	ν_4
Longueur d'onde	962	432	1025	579
		442	1047	592
		5962	1087	608

III-Discussion

La diffraction des rayons X montre la formation d'une couche d'HA à la surface du 46S6-xRIS après son immersion dans le SBF. En effet, le système de cristallisation de 46S6-8RIS après immersion dans le SBF se transforme d'un système amorphe vers un système hexagonal correspondant ainsi au système de cristallisation de l'HA. Pour les composites 46S6-12RIS et 46S6-20RIS, nous remarquons la transformation du diffractogramme mais vers un autre composite différent à celui de l'HA. Ces résultats nous amènent à penser que plus la quantité de risédronate est faible plus que l'efficacité et la réactivité chimique du biomatériau est importante.

Les résultats rapportés par l'étude infrarouge FTIR et RAMAN illustrent la formation d'une couche vitreuse de silicium à l'interface du biomatériau et le milieu physiologique [Dietrich *et al*, 2008]. L'apparition de la phase apatitique et de la couche vitreuse de silicium confirme les interactions chimiques entre le biomatériau et le milieu physiologique environnant comme il a été décrit par Hench *et al*. Ce mécanisme est expliqué par la succession des étapes suivantes : (a) changement rapide des protons H_3O^+ de la solution physiologique avec les ions Ca^{2+} , Na^+ à partir du 46S6 et la formation de Si-OH, (b) rupture des liaisons Si-O-Si du réseau vitreux par hydrolyse. Il s'ensuit une formation des groupements silanols Si-OH à l'interface et un relargage de groupements $\text{Si}(\text{OH})_4$ dans le milieu, (c) condensation et repolymérisation d'une couche riche en silice SiO_2 sur la surface du verre, (d) migration des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} issus du matériau à travers la couche de gel vitreux riche en SiO_2 jusqu'à la surface du verre. À ceux-ci s'ajoutent les ions calcium et

phosphates déjà présents dans le milieu biologique, le tout alimentent le développement d'une couche de phosphate de calcium en surface du matériau (e) cette couche amorphe de phosphate de calcium cristallise en incorporant des anions hydroxyles OH^- et carbonates CO_3^{2-} issus du milieu et se transforme en une couche mixte d'hydroxyapatite carbonatée analogue à celle présente dans l'os [Hench *et al.*, 1996]. Les résultats rapportés par la microscopie électronique à balayage montrent que la couche d'hydroxyapatite formée à l'interface de 46S6-8RIS est mieux condensée et cristallisée par rapport à celle observée à l'interface de 46S6, ceci illustre bien le bon effet d'incorporation de risédronate dans la matrice vitreuse de verre bioactif avec une faible teneur (8%). Les analyses effectuées par ICP-OES ont montré que l'introduction du risédronate dans la matrice vitreuse inhibe le relargage du silicium pendant la première période d'immersion. Par la suite, la quantité de silicium relarguée dans le SBF est fortement diminuée par rapport au 46S6, ce qui est caractérisé par un ralentissement de la dissolution de la matrice vitreuse. Ce résultat est expliqué par la présence du risédronate dans la matrice vitreuse de 46S6. Les bisphosphonates (BPs) se fixent sur le cristal d'apatite. Cette fixation sur le cristal osseux explique leur grande rémanence (plusieurs années pour certaines molécules) essentiellement des inhibiteurs de la résorption osseuse. Ils sont donc utilisés dans toutes les maladies osseuses où existe une hyper résorption. Ils ont probablement d'autres actions sur le tissu osseux, moins bien connues : ils pourraient améliorer la minéralisation, modifier la cristallinité de l'apatite, améliorer l'architecture osseuse. La concentration en calcium dans le SBF décroît plus rapidement pour le verre dopé au risédronate que pour le verre pur. Le relargage de silicium est moins intense chez les composites 46S6-xRIS ce qui explique que leur dissolution est lente par rapport au verre pur. La libération du silicium participe à la dissolution du verre bioactif et la formation d'une couche vitreuse sur laquelle va se fixer un dépôt apatitique [Wers *et al.*, 2015]. Le calcium est donc incorporé plus rapidement à la surface de 46S6-xRIS pour former la couche de phosphate de calcium.

IV-Conclusion

L'introduction du risédronate dans la composition du verre bioactif ralentit fortement la dissolution de la matrice vitreuse. Le relargage de silicium est faible pendant le premier jour d'immersion et la quantité de calcium relarguée est également fortement diminuée avec le temps. Le verre dopé au risédronate est plus stable chimiquement.

Partie 2 : Test in vitro sans cellules (Immersion dans le SBF) des biomatériaux synthétisés

Concernant la croissance et la cristallisation de la couche de phosphate de calcium, peu de différences sont observées entre le verre pur et le 46S6-8RIS. Les autres composites 46S6-12RIS et 46S6-20RIS sont recouverts d'une couche de phosphate de calcium amorphe.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

*Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé).
Application chez des rattes irradiées aux rayons
gamma.*

I-Introduction

Les verres bioactifs présentent la double capacité de relarguer des concentrations adéquates de certaines espèces ioniques et de stimuler la formation d'une couche d'hydroxyapatite après immersion dans des fluides biologiques synthétiques tel que le « Simulated Body Fluide (SBF) ». Le SBF a une composition ionique similaire à celle du plasma sanguin humain. Les verres bioactifs sont des biomatériaux présentant une structure amorphe ce qui facilite l'incorporation d'autres éléments dans leur matrice vitreuse améliorant ainsi ses propriétés physiologiques et biologiques. Ce chapitre 3, du présent manuscrit est basé sur l'évaluation d'une vitrocéramique dopée à l'oxyde de zinc et au nitrure de titane et ayant une porosité expansée noté 46S6-10Zn-2Ti. Les éléments chimiques qui ont été choisis présentent des effets positifs sur la capacité de ce matériau dans la restauration des tissus osseux. En effet, le Zn favorise la prolifération et le développement des ostéoblastes, grâce à sa capacité de stimuler la repousse osseuse et à prévenir la résorption de l'os [Hashizume *et al*, 1993]. Des tests *in vitro*, des verres associés au Zn constituent une approche préliminaire du comportement de notre verre bioactif. Les tests *in vitro* s'effectuent par immersion des échantillons dans une solution de SBF. Ainsi, le choix de cette solution permet de vérifier la capacité du matériau à la précipitation d'hydroxyapatite à la surface de nos verres [Oudadesse *et al*, 2011].

Les matériaux étudiés qui présentent des propriétés intéressantes seront étudiés par des tests *in vivo*. Des travaux antérieurs dans notre laboratoire UMR CNRS 6226 Sciences Chimiques de Rennes, groupe Biomatériaux ont eu pour but de mettre en évidence et de comprendre la réactivité de différents verres étudiés : verres bioactifs purs et dopés au zinc avec une concentration de 10 % (% massique). L'étude du verre de référence 46S6 permet d'étudier l'influence de l'introduction de cet élément dopant sur biocompatibilité des verres après son implantation dans l'os trabéculaire chez des rattes ostéoporotiques.

Le traitement thermique de la vitrocéramique dopée à l'oxyde de zinc et au nitrure de titane permet l'incorporation du titane dans la matrice de composite et l'évaporation de l'azote ce qui permet la création d'une porosité très importante. En effet, le 46S6-10Zn-2Ti possède des pores de borgognes ouvertes et des pores d'interconnections. L'incorporation de Ti dans la matrice vitreuse du 46S6-10Zn-2Ti a amélioré sa biocompatibilité et la présence des pores

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

favorise les phénomènes d'ostéointégration et de néovascularisation, donnant à ce composite des propriétés mécaniques très importantes.

II-Résultats

L'ostéoporose a été créée chez les rattes après 3 semaines de l'exposition de ses condyles fémoraux à différentes doses des rayons gamma allant de 1 jusqu'au 15Gy.

II-1- Etude biologique

II-1-1- Exploration hématologique et biochimique

a-Etude hématologique

Les paramètres hématologiques montrent une augmentation de globules blancs (GB) et une diminution des autres paramètres tels que les globules rouges (GR), MCT, hémoglobine (HGB), hématocrite (HCT) et des plaquettes (PLT). Ces résultats sont dus à l'effet de l'irradiation induisant la perturbation de la synthèse et la production des cellules sanguines à partir des cellules souches. Une faible modification a été enregistrée après implantation avec 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti, ceci est expliquée d'une part par l'effet locale des implants et d'autre part par la durée des implantations (Tableau 1).

Tableau 1 : Variation des taux sériques des paramètres hématologiques.

	Témoin	46S6-1Gy	46S6-15Gy	46S6-10Zn-2Ti 1Gy	46S6-10Zn-2Ti 15Gy
GB ($10^3/\text{mm}^3/\mu\text{g}$)	10,1 ± 0,3	11,1 ± 0,4	20,2 ± 0,2	10,2 ± 0,3	10,2 ± 0,1
BR(10^3mm^3 of blood)	7,2 ± 0,4	5,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	6,3 ± 0,4	1,1 ± 0,2
Hb(g/dl of blood)	12,4 ± 0,7	9,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	11,1 ± 0,3	3,2 ± 0,5
HCT (%)	47,3 ± 0,8	30,2 ± 0,8	8,2 ± 0,1	45,2 ± 0,3	15,1 ± 0,9
VGM	53,5 ± 0,8	52,2 ± 0,4	20,3 ± 0,3	53,2 ± 0,6	25,1 ± 0,8
PLT	1716,1 ± 0,9	1529,1 ± 0,4	982,1 ± 0,2	1644,2 ± 0,1	11,1 ± 0,7

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

b-Etude biochimique

Après l'irradiation des rattes à différentes doses des rayons γ allant de 1 à 15Gy, nous remarquons la diminution des paramètres biochimiques (Calcium (Ca), Phosphore (P) et la Phosphatase alcaline (PAL)) dans tous les groupes irradiés en comparaison avec le groupe témoin. Cette diminution croît proportionnelle avec l'augmentation de la dose d'ionisation. Ceci nous amène à penser que la dégradation de la matrice osseuse progresse avec l'augmentation de l'irradiation. En effet, la PAL, le Ca et le P sont des éléments majeurs qui interviennent dans les processus de remodelage, de renouvellement et de minéralisation de la trame osseuse.

Après implantation avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti, nous remarquons une restauration des taux de la phosphatase alcaline dans tous les groupes mais la correction la plus importante est enregistrée chez les groupes implantés avec la 46S6-10Zn-2Ti. En effet, Δ (Υ PAL) (Figure1) varie entre les groupes irradiés à 1Gy et 15Gy entre les groupes 46S6 et les groupes 46S6-10Zn-2Ti de 3,4% à 29,3%. En comparant l'augmentation des valeurs de la PAL obtenues après implantation avec le 46S6 et avec le 46S6-10Zn-2Ti, nous remarquons que la restauration des valeurs de cet enzyme est plus importante chez les groupes 46S6-10Zn-2Ti, ce qui nous amène à penser que le zinc intervient dans le rétablissement des taux de la PAL et par conséquent la réparation de la repousse osseuse.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

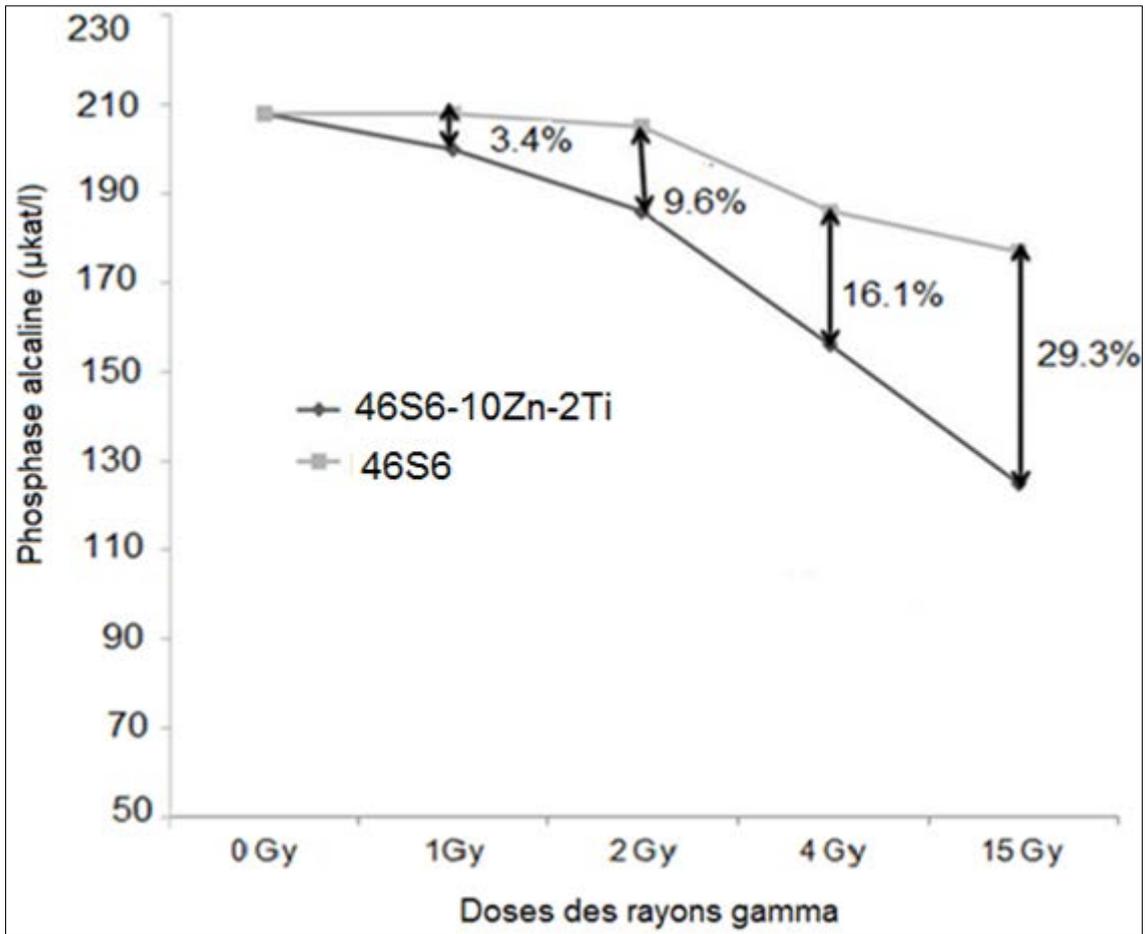


Figure 1: Variation des taux sériques de la phosphatase alcaline (µKat/l) chez les rattes témoins et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.

II-1-2- Etude de la balance oxydative

a- Analyse de la peroxydation lipidique évaluée par la détermination des taux de malondialdéhyde (MDA)

Après l'irradiation des rattes avec différentes doses de rayons γ allant de 1 à 15Gy, nous remarquons une augmentation proportionnelle du taux de malondialdéhyde (MDA) avec les doses des rayons γ ce qui explique l'augmentation de la peroxydation lipidique et l'oxydation avec les doses reçues. En effet l'ionisation induit la production des radicaux libres ce qui stimule l'augmentation de la production du stress. L'implantation avec le verre bioactif pur (46S6) et la 46S6-10Zn-2Ti semblent atténuer l'effet de l'irradiation sur

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

la production de la peroxydation lipidique. Mais la décroissance la plus importante est notée chez les groupes implantés avec la 46S6-10Zn-2Ti. En effet, Δ (τ MDA) varie entre les groupes irradiés à 1Gy et 15Gy entre les groupes 46S6-10Zn-2Ti et les groupes 46S6 de 4% à 30%. Ce résultat nous amène à penser que l'incorporation de zinc et de titane dans la matrice du 46S6-10Zn-2Ti induit le rétablissement des taux de MDA (Figure 2).

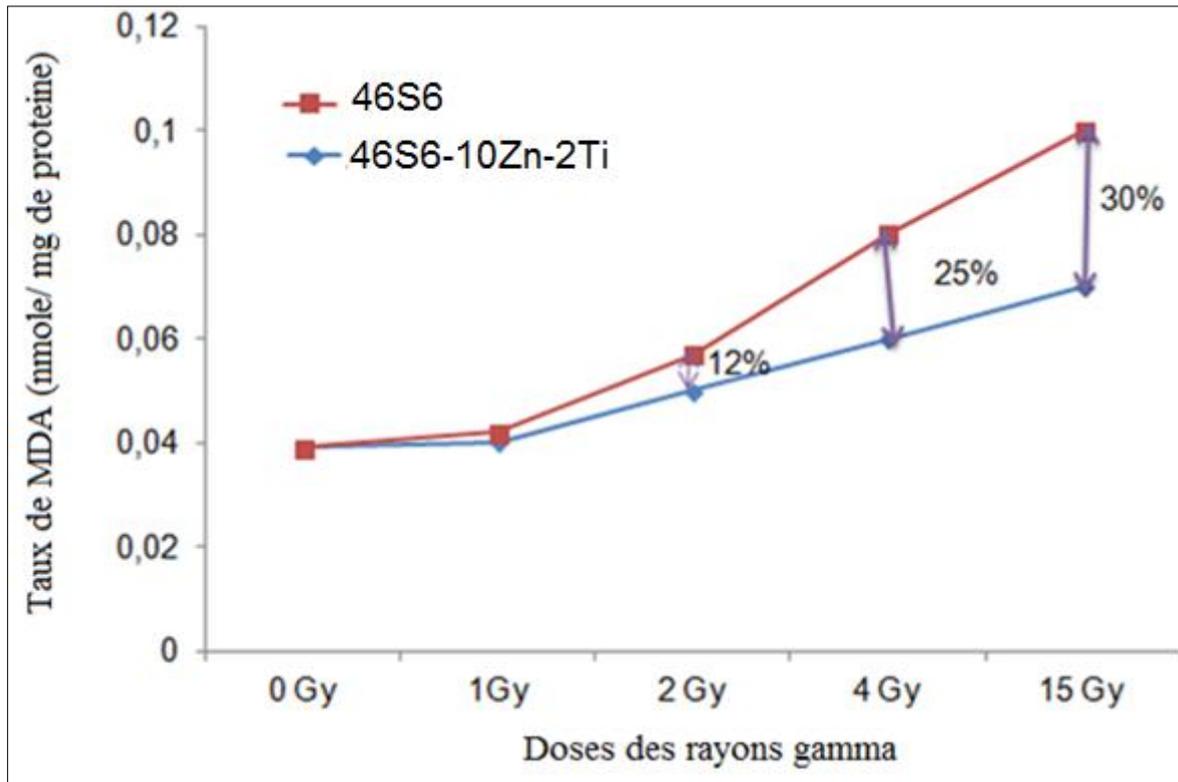


Figure 2 : Taux des MDA dans l'os (nmol/mg des protéines) chez des rattes témoins et des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.

a- Mesure des activités de CAT, SOD et GPx:

Les résultats qui sont rapportés par les figures 3, 4 et 5 montrent l'atténuation des activités des CAT, SOD et GPx dans tous les groupes irradiés en comparaison avec le groupe de control. En effet, nous remarquons la diminution du Δ (τ CAT) entre les groupes 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti de 11 à 44,5 chez les animaux irradiés respectivement à 1 et à 15Gy. Aussi Δ (τ GPx) diminue entre les même groupes et qui ont reçu respectivement les même doses de rayons γ de 20% à 75%. Les résultats rapportés par le dosage de l'activité du SOD sont en

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

accord avec les autres résultats. Δ (τ SOD) a été atténué entre les groupes 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti de 2, 6% à 12, 1% chez les animaux irradiés respectivement à 1 et 15Gy. La diminution de l'activité de ces enzymes après l'exposition des rattes à différentes doses des rayons γ montre l'effet de l'ionisation sur la balance oxydative par la perturbation et la diminution des enzymes antioxydantes. L'elevation la plus importante est enregistrée chez les groupes irradiés et implantés avec le 46S6-10Zn-2Ti. Ces résultats expliquent le rôle de zinc dans la restauration de la balance oxydative. Ceci nous amène à mettre l'hypothèse que le zinc intervient et stimule les processus de synthèse de ces enzymes. De même la présence de Zn induit la superproduction de ces derniers. Ces résultats argumentent et mettent en évidence le rôle antioxydant du zinc qui intervient essentiellement en tant que cofacteur de la SOD zinc dépendante

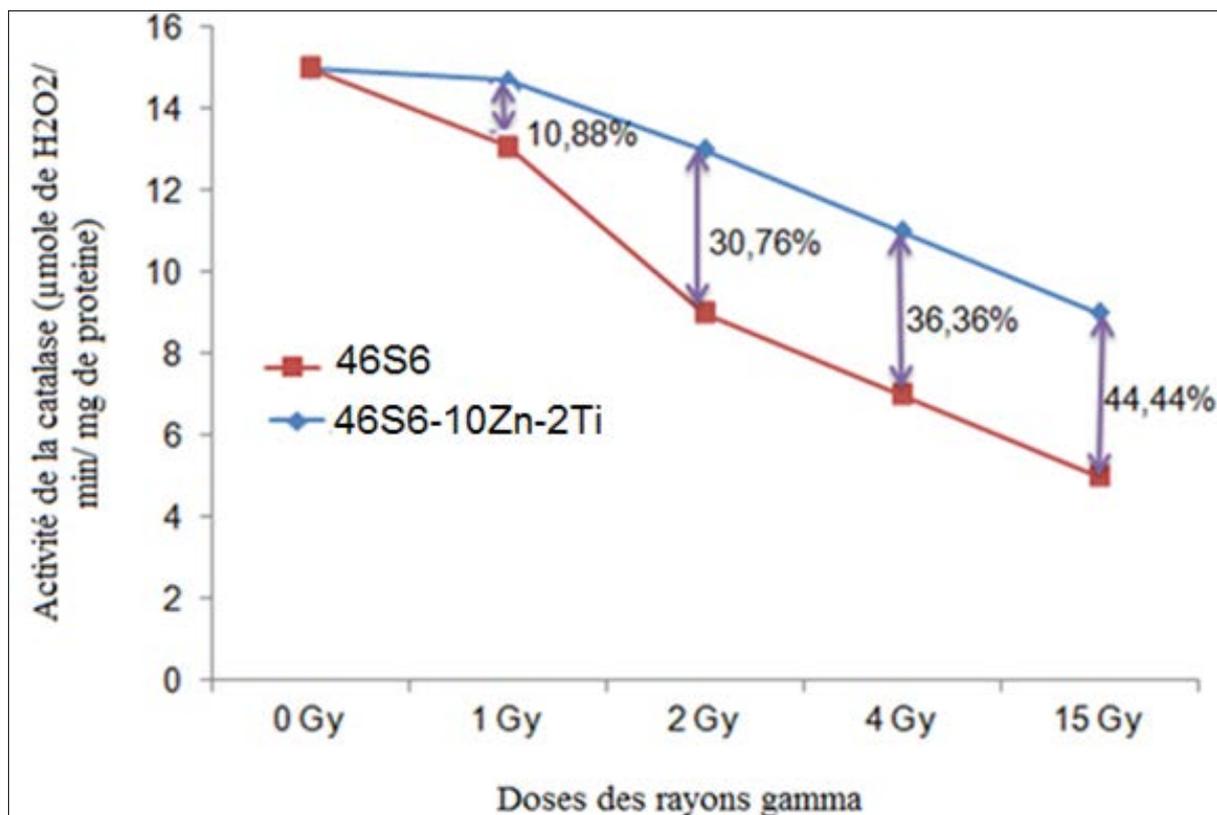


Figure 3 : Activité des CAT dans l'os (μ moles de H_2O_2 /min/mg de protéines) chez des rattes témoins et des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rats irradiés aux rayons gamma

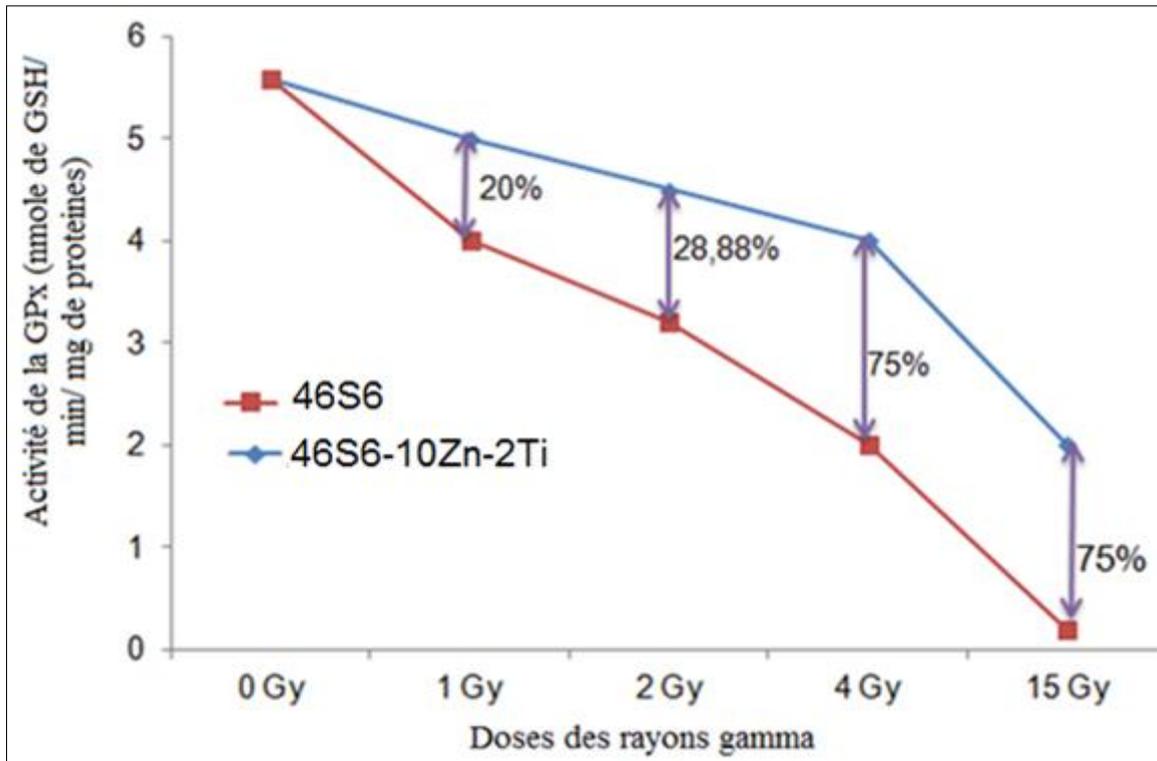


Figure 4 : Activité des GP_x dans l'os (nmol GSH/min/mg de protéines) chez des rats témoins et des rats irradiés et implantés avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

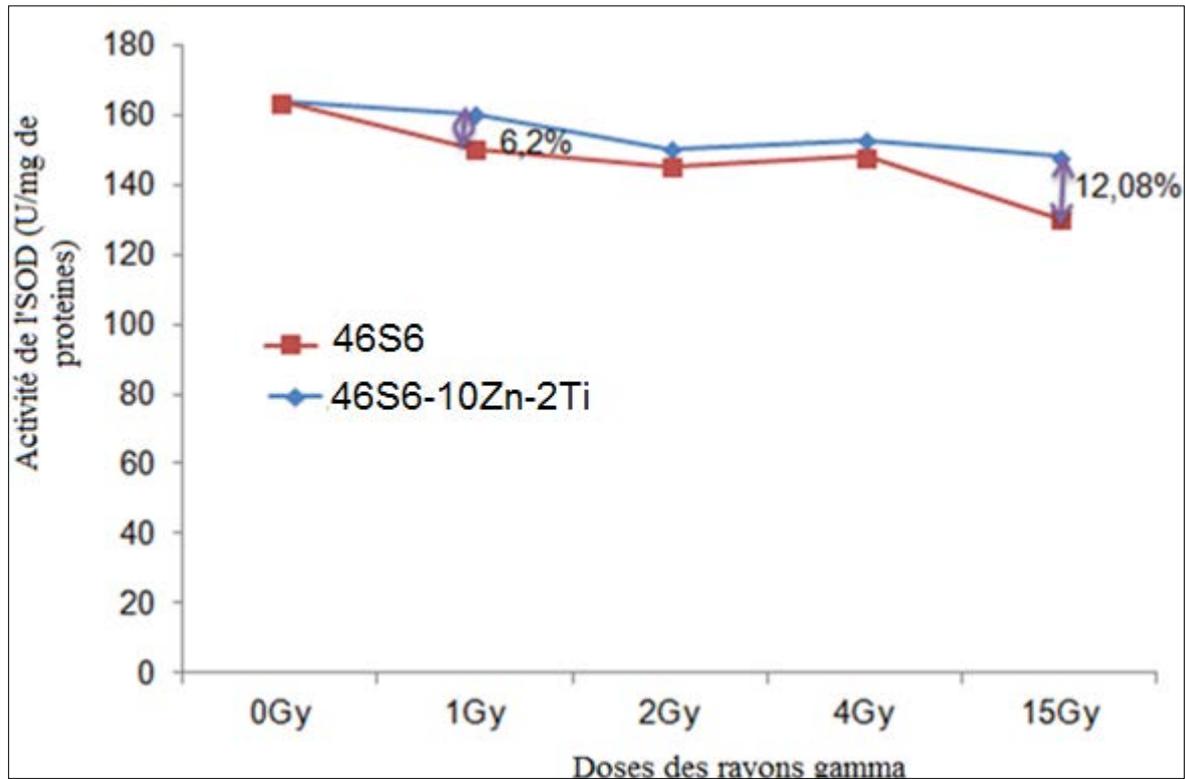


Figure 5: Activité des SOD dans l'os (unité SOD/mg de protéines) chez des rattes témoins et des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti.

II-1-3- Investigation histologique

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 comparer les différents aspects de tissu osseux avant et après implantation avec la vitrocéramique 46S6-10Zn-2Ti chez des rattes irradiées à 2 et 15Gy (Figure 7, 6 et 8).

Ainsi le groupe témoin irradié à 2Gy montre la déconnexion des trabécules osseuses, mais il a été dominé par un tissu minéralisé calcifié (Figure 6A). Alors que le groupe de contrôle irradié à 15Gy (Figure 6B) montre aussi la dégradation du tissu osseux mais il a été dominé par un tissu osseux ostéoïde. Ceci indique que la dégradation du tissu osseux et la création d'ostéoporose sont plus avancées chez les rattes irradiées à 15Gy.

L'implantation avec le 46S6-10Zn-2Ti semble corriger cette altération osseuse chez les deux groupes. En effet, après 30 jours d'implantation du 46S6-10Zn-2Ti chez le groupe

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

irradié à 15Gy (Figure 7) nous signalons que le tissu est dominé par un tissu osseux ostéoïde avec la présence des vaisseaux sanguins. Ceci indique le début d'ostéogenèse témoigné par la présence du néo synthèse osseuse. Alors qu'après implantation du 46S6-10Zn-2Ti chez les rattes irradiées à 2Gy (Figure 8) nous remarquons que le tissu osseux est dominé par un tissu minéralisé mature. Ainsi, nous concluons que l'implantation du 46S6-10Zn-2Ti chez le groupe irradié à une faible dose a corrigé l'effet délétère de l'irradiation sur la trame osseuse. En effet, les processus d'ostéogenèse et de remodelage osseux sont presque totaux. Ce résultat est expliqué d'une part par la présence de zinc qui favorise la différenciation et la prolifération otéoblastique et d'autre part par la présence de titane ce qui facilite la tolérance et l'acceptation du biomatériau par le corps vivant mais essentiellement par la présence de la porosité. En effet notre composite possède une porosité hétérogène : des pores ouvert, des et des pores d'interconnexion. Ces derniers facilitent l'échange entre le milieu biologique et le biomateriau et assure l'integration rapide des cellules osseuses et la formation des reseaux cellulaires ce qui induit sa degradation et son remplacement par le tissu osseux.

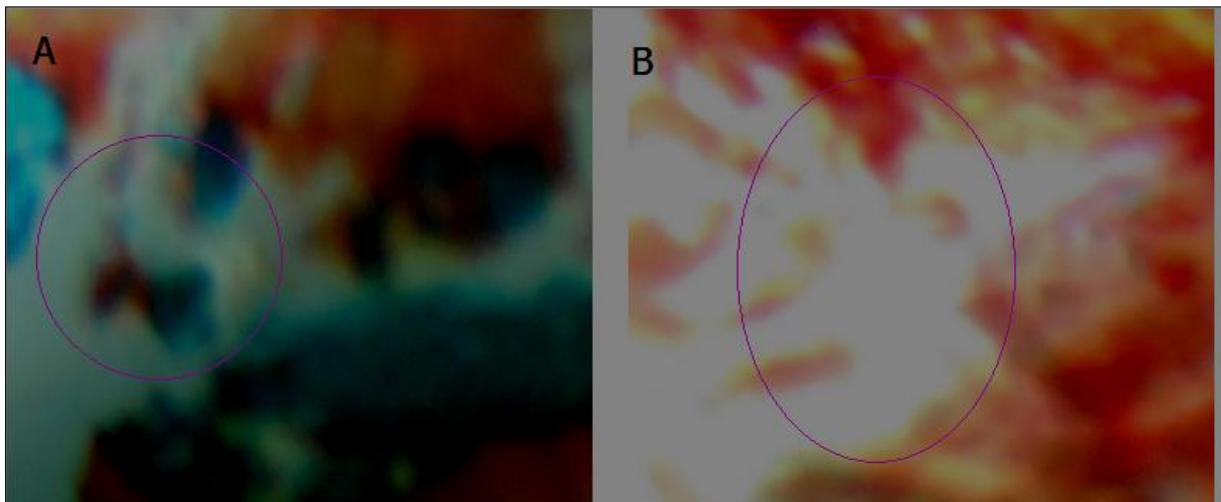


Figure 6 : Coupe histologique des rattes irradiées à 2Gy (A) et rattes irradiées à 15Gy (B).

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

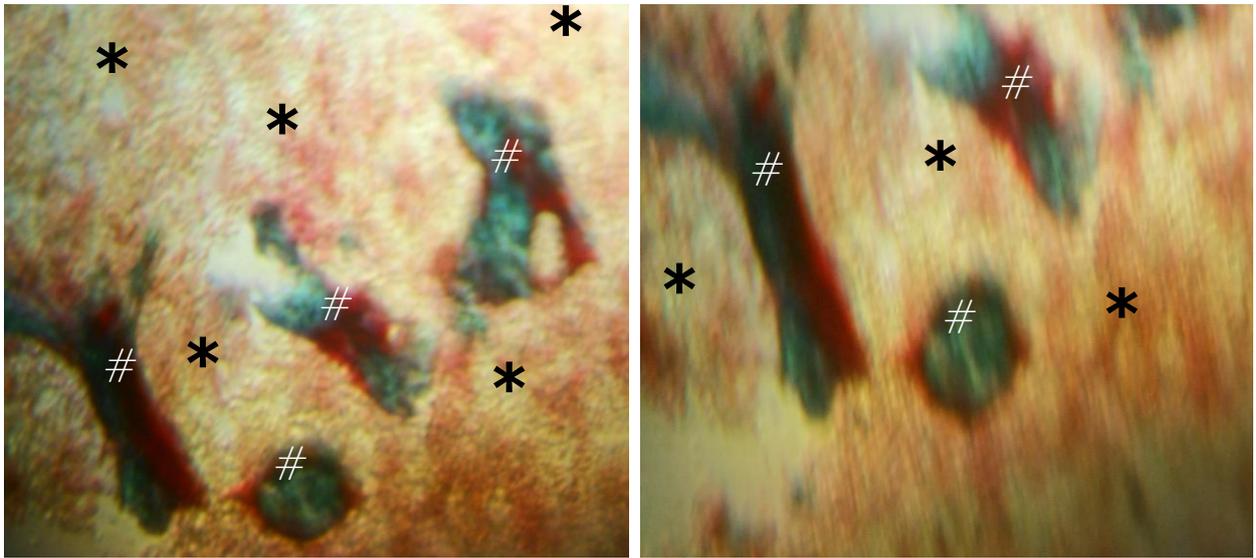


Figure 7 : Coupe histologique des rattes irradiées à 15Gy et implantées avec le 46S6-10Zn-2Ti après 30 jours

: Tissu minéralisé, * : Tissu ostéοide

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

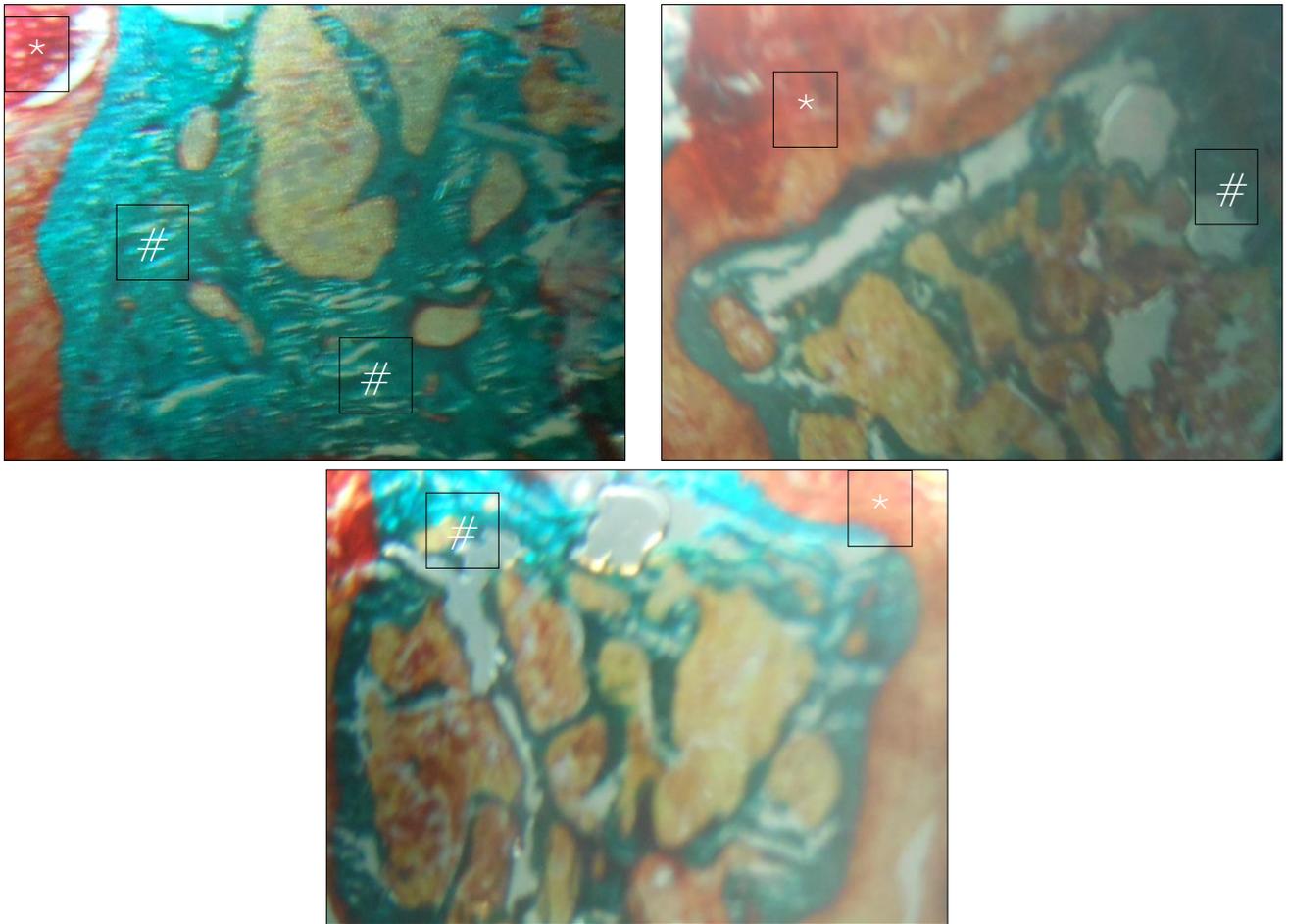


Figure 8 : Coupe histologique des rattes irradiées à 2Gy et implantées avec le 46S6-10Zn-2Ti après 30 jours

: Tissu minéralisé, * : Tissu ostéοide

II-2-Etudes physicochimiques

II-2-1-Spectroscopie d'absorption infrarouge

Les spectres IR recueillis des poudres de 46S6 et de 46S6-10Zn-2Ti, avant et après implantation (Figures 9 et 10) montrent des changements qui sont dūe aux interactions avec le tissu biologique environnant. En effet, le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti avant implantation montrent des spectres qui présentent une bande attribuée à une déformation angulaire Si-O-Si

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

entre les trois tétraèdres SiO_4 . Il présente aussi 3 bandes obtenues vers 745, 932 et 1036 cm^{-1} correspondants au Si-O et une bande de P-O à une longueur d'onde de 590 cm^{-1} .

Les biomatériaux 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti après 1 mois d'implantation, chez des rattes irradiées, montrent des évolutions qui mettent en relief leurs dégradations et résorptions et leurs transformations en apatite biologique. Chez le groupe témoin nous remarquons la présence de toutes les bandes caractéristiques d'une hydroxyapatite biologique. En effet, on note la présence des deux bandes P-O dont la première s'étale entre $552-560 \text{ cm}^{-1}$ et la deuxième se situe entre 1008 et 10095 cm^{-1} . Aussi nous notons la présence de deux bandes de C-O, la première se trouve à une longueur d'onde de 897 cm^{-1} et la seconde s'élargie entre 1348 et 1490 cm^{-1} . De même nous détectons la présence des amides I, II, III, qui illustre la présence de la matrice organique, à des longueurs d'ondes de $1228, 1548, 1682 \text{ cm}^{-1}$. Le même résultat est observé chez le groupe 46S61Gy alors que chez les groupes 46S6 2Gy et 46S6 4Gy, nous remarquons l'atténuation des intensités des deux bandes de P-O et des carbonates. La diminution d'intensité de ces bandes illustre bien l'incapacité de 46S6 à restaurer l'effet des doses d'irradiation supérieur à 2Gy. Chez le groupe 46S6 15Gy nous notons une réduction de l'intensité de toutes les bandes caractérisant l'hydroxyapatite ce qui nous amène à conclure que la destruction de la structure apatitique est presque totale (Figure 9).

Le spectre de 46S6-10Zn-2Ti1Gy montre une structure similaire à celle du témoin chez lequel nous notons la présence de toutes les bandes de l'HA. Chez le 46S6-10Zn-2Ti 2Gy, il ya aussi une réduction des bandes de P-O et de carbonates mais chez les groupes 46S6-10Zn-2Ti 4Gy et 46S6-10Zn-2Ti 15Gy l'atténuation et la diminution de l'intensité de ces dernières bandes sont accentuées avec la persistance de la structure apatitique. Ceci explique et argumente le rôle de Zn et de Ti dans la minéralisation et le remodelage du tissu osseux et la biocompatibilité de cette composite (Figure 10).

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

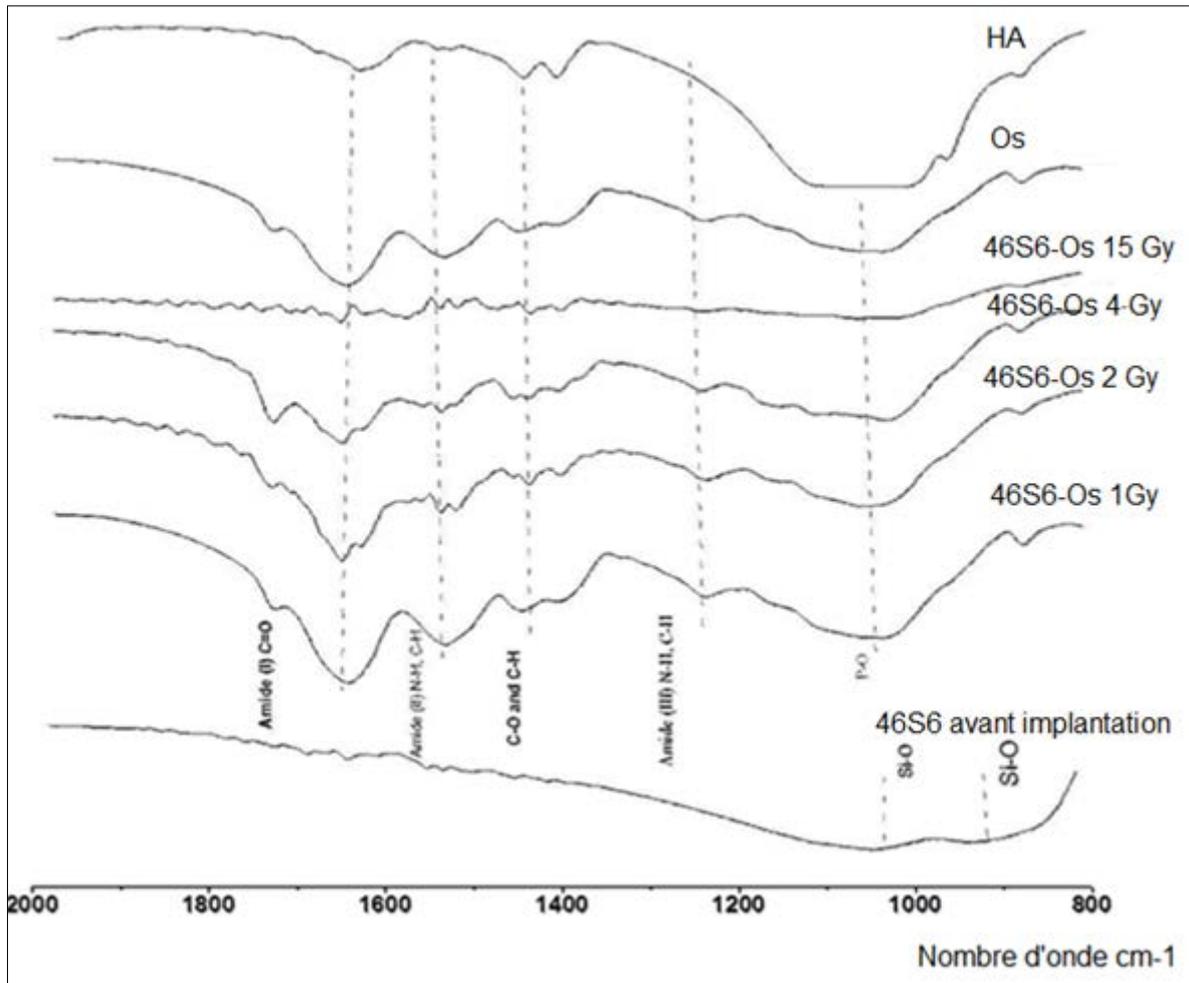


Figure 9 : Spectres IR du 46S6 après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à différentes doses de rayons γ

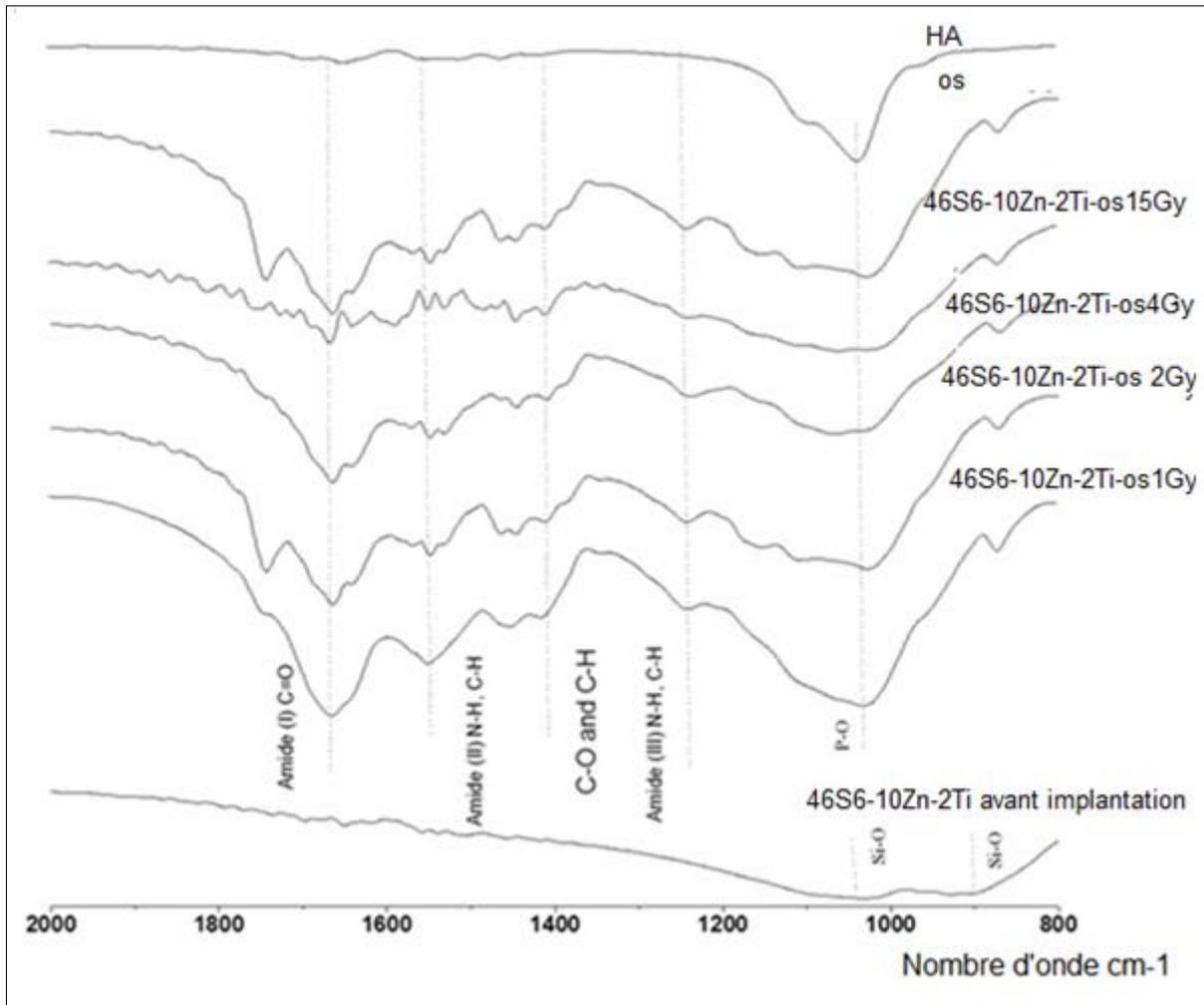


Figure 10 : Spectres IR du 46S6-10Zn-2Ti après 1 mois d'implantation chez des ratte irradiées à différentes doses de rayons γ .

II-2-2-Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes DRX des poudres recueillies de 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti avant et après implantation (Figure 11 et 12) montrent des changements structuraux. En effet 46S6 avant implantation montre une structure amorphe. La vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane (46S6-10Zn-2Ti) illustre la présence de deux phases cristallines référencées dans le JCPDS: une phase majoritaire ($\text{Na}_4\text{Ca}_4\text{Si}_6\text{O}_{18}$) et une phase secondaire ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) [Wers *et al*, 2014]. Après 1 mois de son implantation dans des condyles fémoraux des ratte, ayant des défauts osseux suite à son exposition à différentes doses d'ionisation allant de 1 jusqu'au 15Gy, nous remarquons des changements qui sont dûe à l'interaction avec

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

l'environnement osseux. En effet chez les groupes 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti 1Gy on note la présence de toutes les raies caractéristiques de l'apatite biologiques. Ainsi, nous notons la présence de toutes les raies 26° , 32° , 40° , 47° , 50° , 53° et 67° (2θ) correspondant respectivement aux plans de réflexions de l'hydroxyapatite (002), (211), (310), (222), (213), (004) et (213). Ceci illustre bien que ces deux biomatériaux échangent d'éléments avec l'os ostéoporotique en se dégradant et se résorbant toute en laissant la place pour les dépôts apatitiques néoformés. En effet, l'évolution structurale de 46S6 et de 46S6-10Zn-2Ti vers une structure similaire à celle de l'HA montre la dégradation et la résorption de ces deux biomatériaux et leurs remplacements par le tissu osseux. Avec l'augmentation de la dose des rayons γ à 2Gy nous remarquons la diminution du nombre de raies caractéristiques de l'hydroxapatite avec l'augmentation de l'irradiation. Chez les groupes 46S6 2Gy et 46S6-10Zn-2Ti 2Gy nous notons la disparation des deux raies (004) et (304). Tandis que chez les groupes 46S6 15Gy et 46S6-10Zn-2Ti 15Gy nous notons chez le premier la présence de deux raies correspondant au 32° et 40° et chez le 2^{ème} nous notons la persistance des 4 raies. L'hydroxyapatite formée à l'interface os-46S6-10Zn-2Ti est mieux cristallisée que celle former à l'interface 46S6-os. Ces résultats confirment et montrent le rôle de Zn et Ti dans la formation et la minéralisation du tissu osseux et par conséquent sa capacité à restaurer l'effet des faible, moyenne et forte doses d'irradiation (Figure 11 et 12).

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

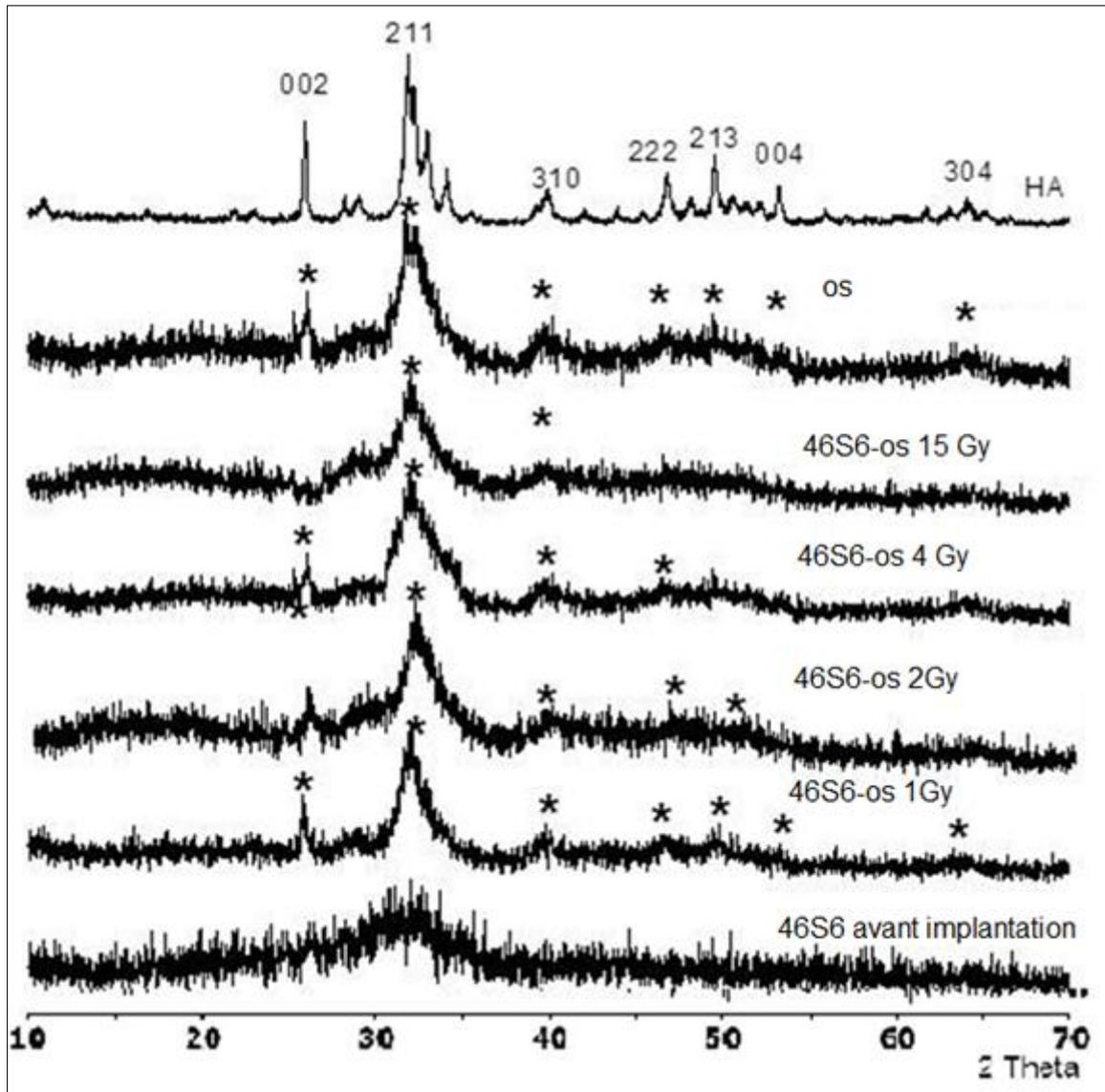


Figure 11: DRX du 46S6 après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à différentes doses de rayons γ .

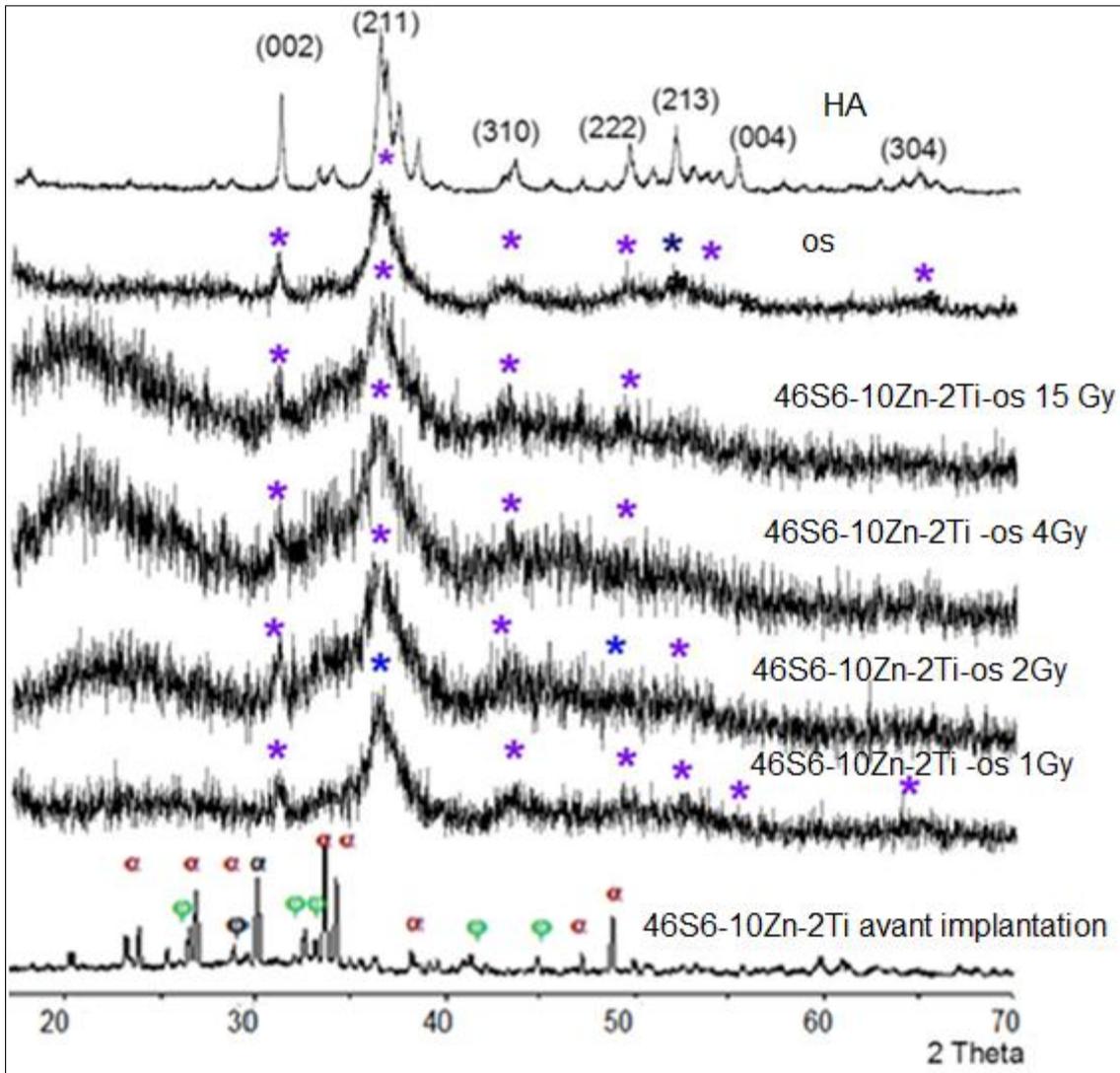


Figure 12: DRX du 46S6-10Zn -2Ti après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à différentes doses de rayons γ .

II-2-3- Spectrométrie d'émission optique (ICP-EOS)

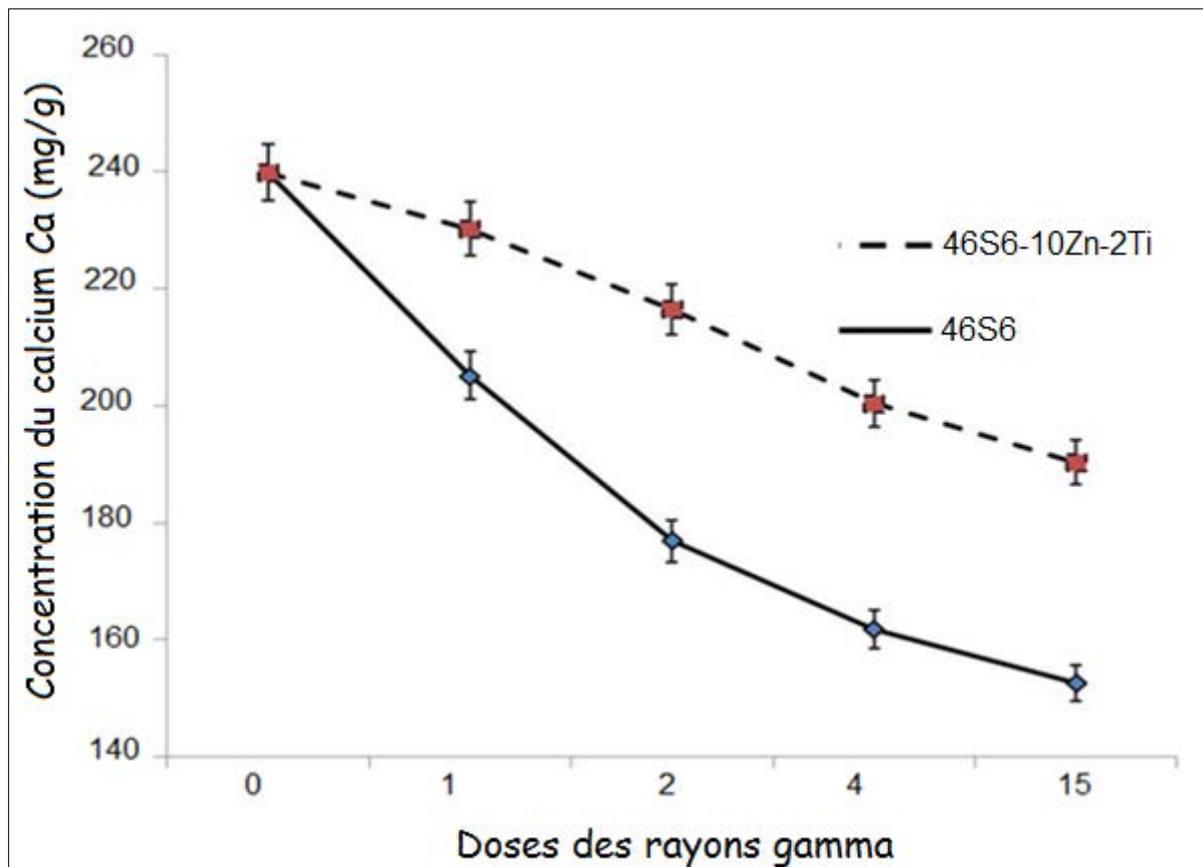
Après 1 mois d'implantation, des rattes irradiées et implantées avec le 46S6 et le 46S6-10Zn2Ti, nous notons des modifications dans la cinétique d'échange des éléments chimiques majeurs et traces entre l'os et les deux bioimplants. En effet, la concentration en calcium chez le groupe de contrôle est de l'ordre de 250 mg /g. Cette concentration diminue progressivement dans les fémurs de rattes irradiées lorsque la dose des rayons gamma augmente. Comme il est indiqué dans la Figure 13, la concentration de calcium diminue avec l'augmentation de l'irradiation. En effet, chez les groupes implantés avec le 46S6, la

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

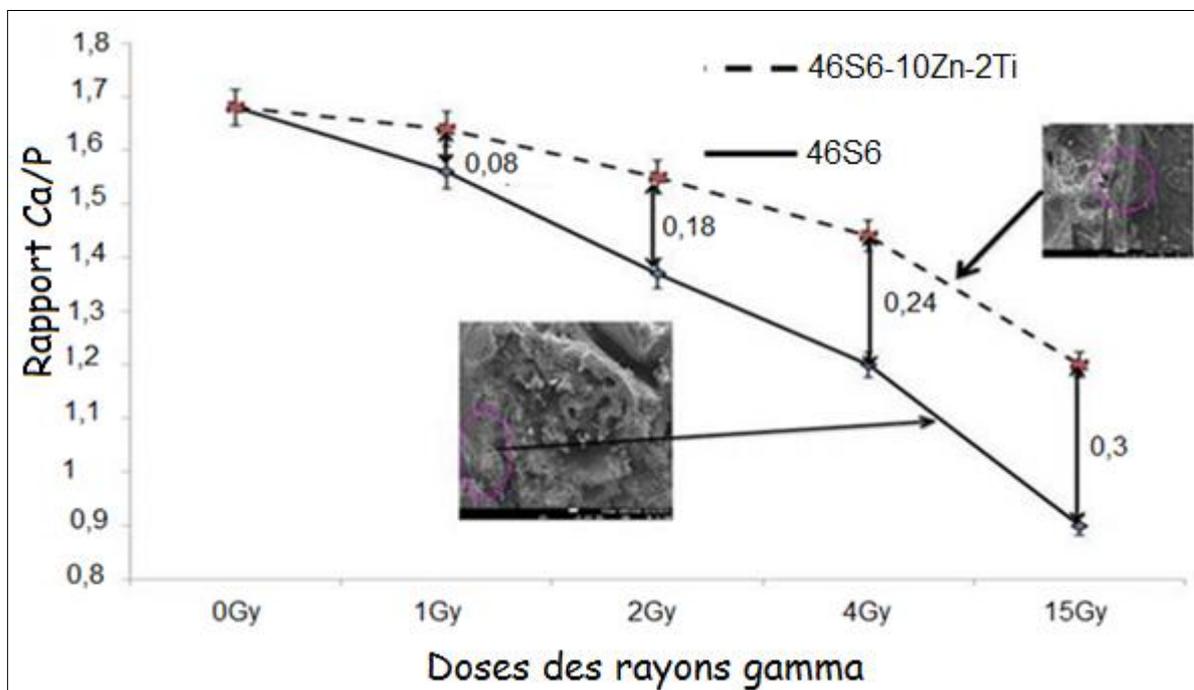
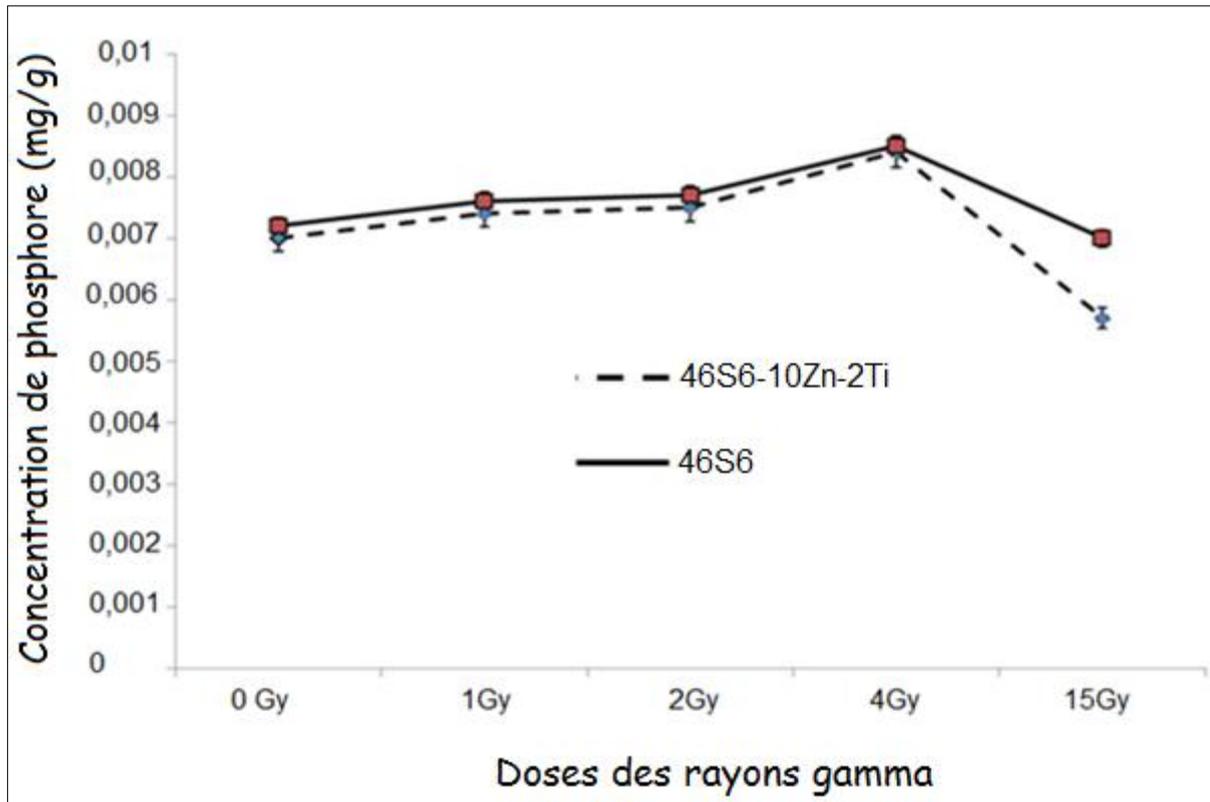
concentration en calcium est atténuée de 204 mg/g chez le groupe 46S6 1Gy jusqu'au 158 mg/g chez le groupe 46S6 15Gy. Alors que chez les groupes irradiées et implantées avec le 46S6-10Zn-2Ti cette valeur a diminuée de 238 mg/g chez le groupe 46S6-10Zn-2Ti 1Gy à 170 mg/g chez le 46S6-10Zn-2Ti 15Gy. La concentration en phosphore montre une faible modification entre tous les groupes. Le rapport phosphocalcique Ca/P suit la même cinétique que celle du calcium. Le rapport Ca/P est de l'ordre de 1,56 chez le groupe 46S6 1Gy illustrant la présence du triphosphate de calcium. Chez les groupes 46S6 2Gy, 46S6 4Gy et 46S6 15Gy le rapport Ca/P est inférieur à 1,55 ce qui illustre et explique l'absence de l'apatite. Ce résultat montre que le 46S6 tous seule est incapable à remédier l'ostéoporose crée suite à l'exposition des rattes à des doses supérieure à 2Gy. Chez les groupes implantés avec le 46S6-10Zn-2Ti, le rapport Ca/P diminue avec l'augmentation des doses d'irradiations. Ainsi, il est de l'ordre de 1,64 chez le 46S6-10Zn-2Ti 1Gy, montrant la persistance de la structure apatitique. Chez les groupes 46S6-10Zn-2Ti 2Gy, le rapport Ca/P variant autour de 1,55 indiquant la présence de triphosphate de calcium. Ces résultats mettent en relief le rôle de zinc dans la restauration de l'effet de l'irradiation avec des doses supérieure à 2Gy expliquant ainsi le rôle de zinc dans la réparation des trabécules osseuses. Comme il est indiqué dans la même Figure 13, les taux de silicium augmentent avec l'élévation des doses d'irradiation et ceci est expliqué par la diminution de la dégradation et de résorption du bioimplant avec l'augmentation d'irradiation.

La même figure illustre la diminution du taux de zinc avec l'augmentation des doses d'irradiation, mais les concentrations les plus importantes sont observées chez les 46S6-10Zn-2Ti 1Gy. Ce résultat montre que les processus de guérissons et de cicatrisation diminuent avec l'augmentation des doses d'irradiation.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma



Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rats irradiés aux rayons gamma



Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

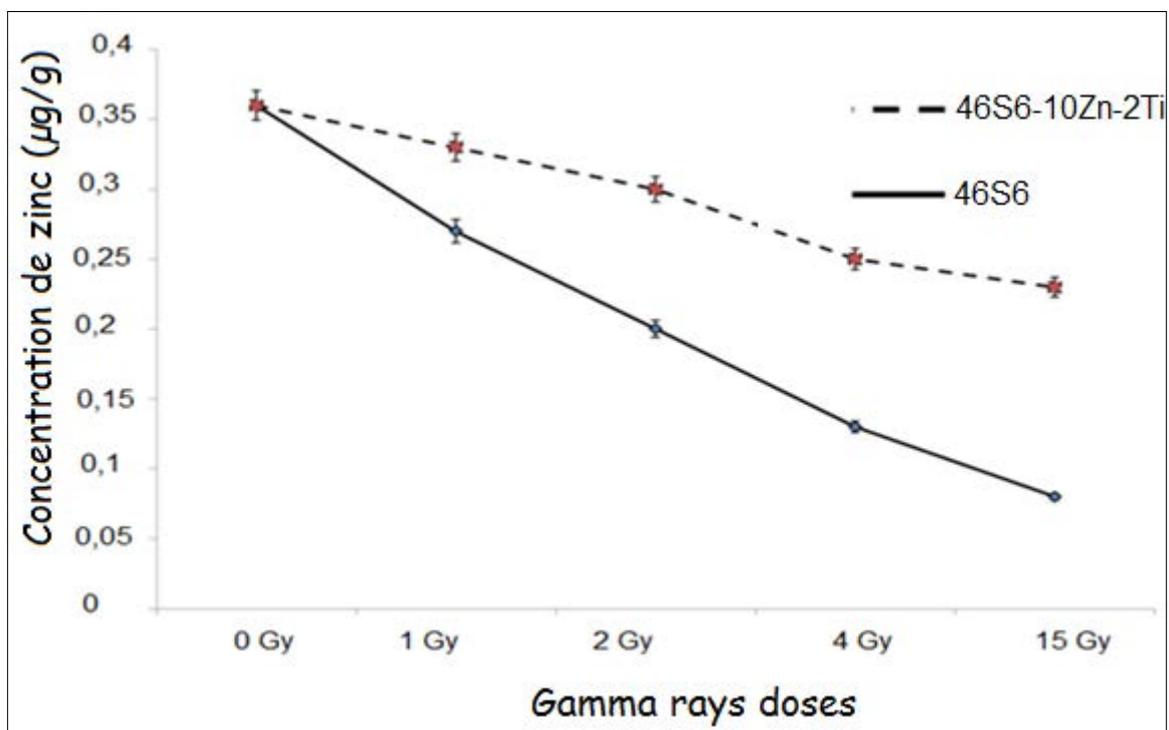
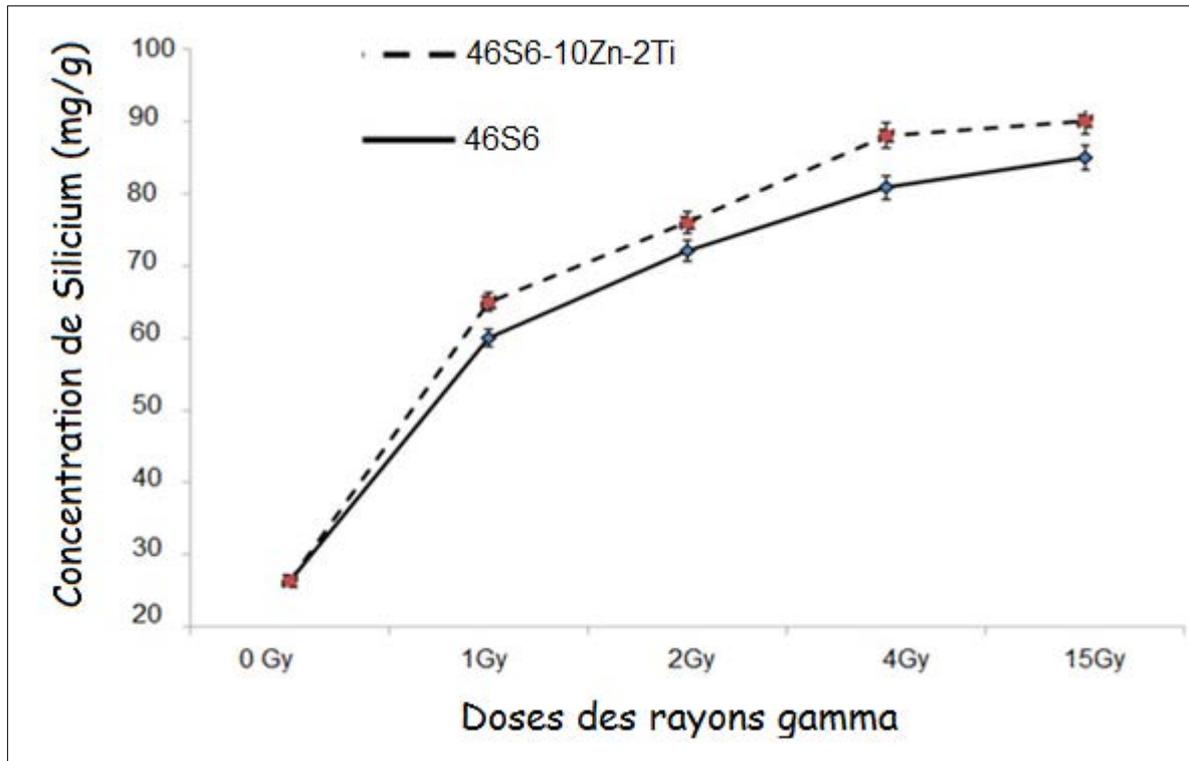


Figure 13 : Variation des concentrations de Ca, de Zn et de Si et du rapport Ca/P entre les différents groupes après 1 mois d'implantation de 46S6 et de 46S6-10Zn-2Ti chez des rattes irradiées.

II-2-4- Etude morphologique par la microscopie électronique à balayage

Après l'irradiation nous remarquons chez le groupe opéré et non implanté la dégradation du tissu osseux et la déconnexion entre les trabécules osseuses. Ceci engendre la création et l'apparition de l'ostéoporose (Figure 14). L'ostéoporose se caractérise par un déséquilibre dans les processus du remodelage du tissu osseux, pouvant être engendré par un déséquilibre entre les processus de formation et de résorption et qui peuvent être aussi dûe à un déséquilibre entre le taux d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. Cela nous amène à penser que l'irradiation ralenti les processus de formation des ostéoblastes ou bien participe dans les processus de leur dégradation. Après implantation avec le verre pur (46S6) nous notons la présence d'un contact intime entre le 46S6 et le tissu osseux ainsi que le début de dégradation du biomatériau en faveur à la formation et le développement d'un dépôt apatitique. Cependant, les processus de dégradation du verre bioactif ont été très lentes (Figure 15). Après implantation avec la vitrocéramique 46S6-10Zn-2Ti, qui présente une porosité expansée (Figure 16A) nous remarquons son dégradation porgressive et la prolifération et le développement du dépôt apatitique. Ce phénomène est inversement proportionnel aux doses des rayons γ reçues. En effet après implantation du 46S6-10Zn-2Ti chez le groupe irradié à 1Gy, on signale la dégradation totale du bioimplant et l'apparition d'un tissu osseux mature (Figure 17A), alors que chez le groupe irradié à 2Gy, le 46S6-10Zn-2Ti est presque dégradé avec la déposition de l'apatite dans les plupart des pores du bioimplant (Figure 17B). Après son implantation chez des rattes irradiées à 4Gy nous remarquons l'invasion des pores du bioimplant par un tissu osseux fibreu immature indiquant les processus de la néosynthèse du tissu osseux (Figure 17C). Son implantation dans des condyles des rattes irradiées à 15Gy montre seulement la juxtaposition entre le biomatériau et le tissu osseux (17D).

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

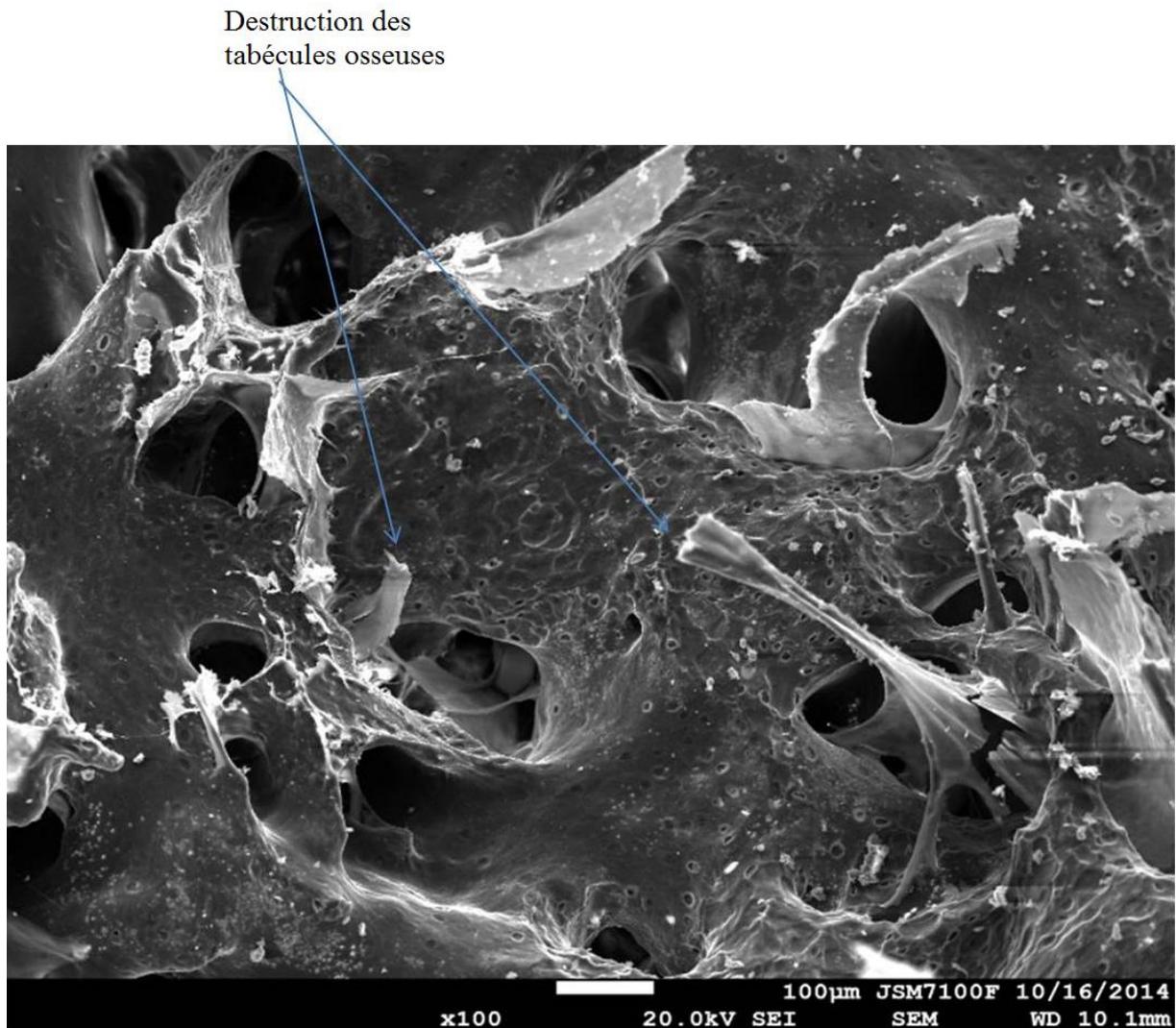


Figure 14 : tissu osseux après 3 semaines d'exposition au rayon gamma

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

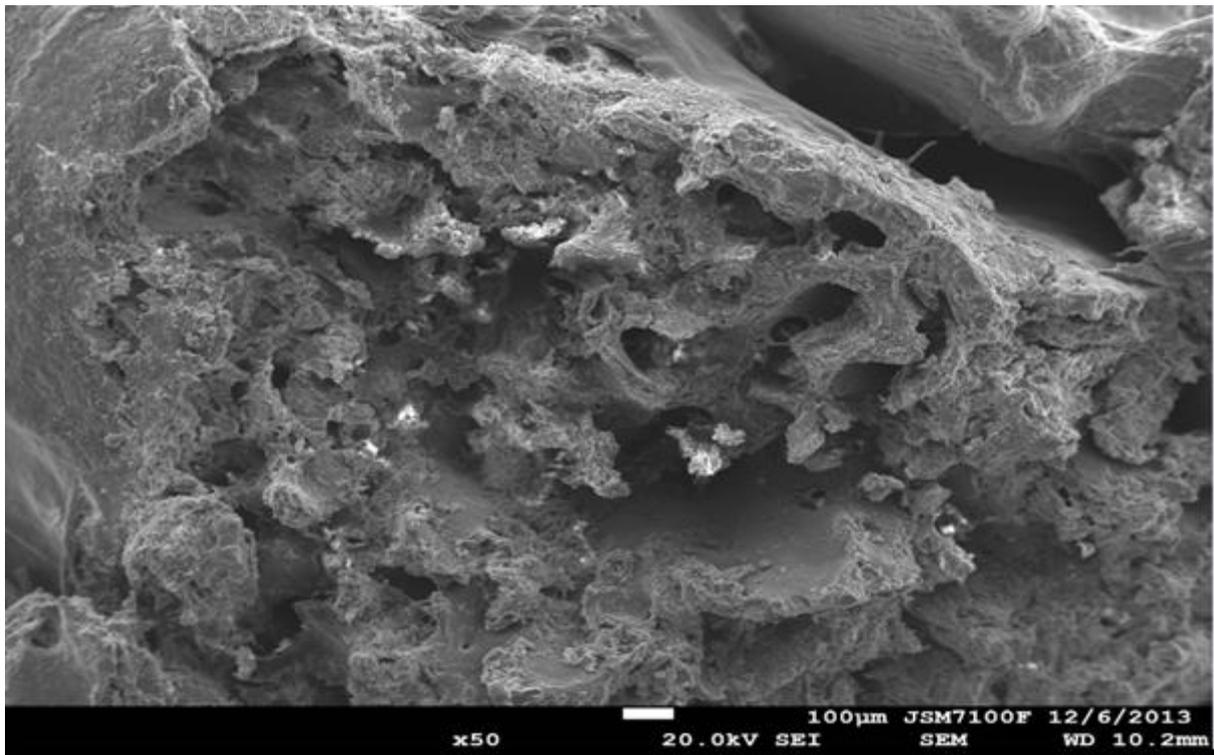


Figure 15 : contact intime entre le 46S6 et le tissu osseux

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

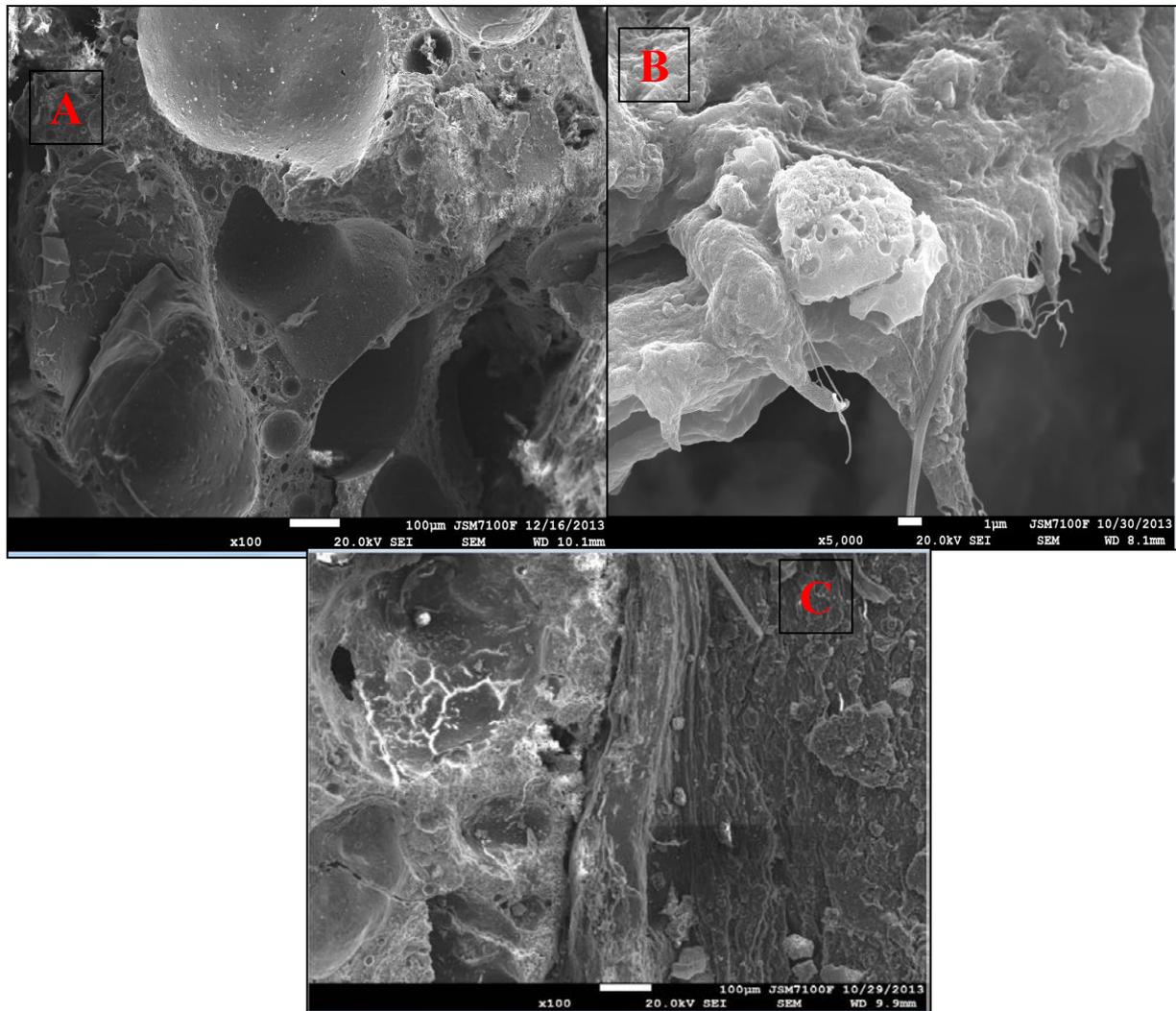


Figure 16: Porosité de l'implant 46S6-10Zn-2Ti (62%) (A), dégradation du verre bioactif et son remplacement par un dépôt apatitique (B) et comportement du verre en contact avec le tissu osseux (C).

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

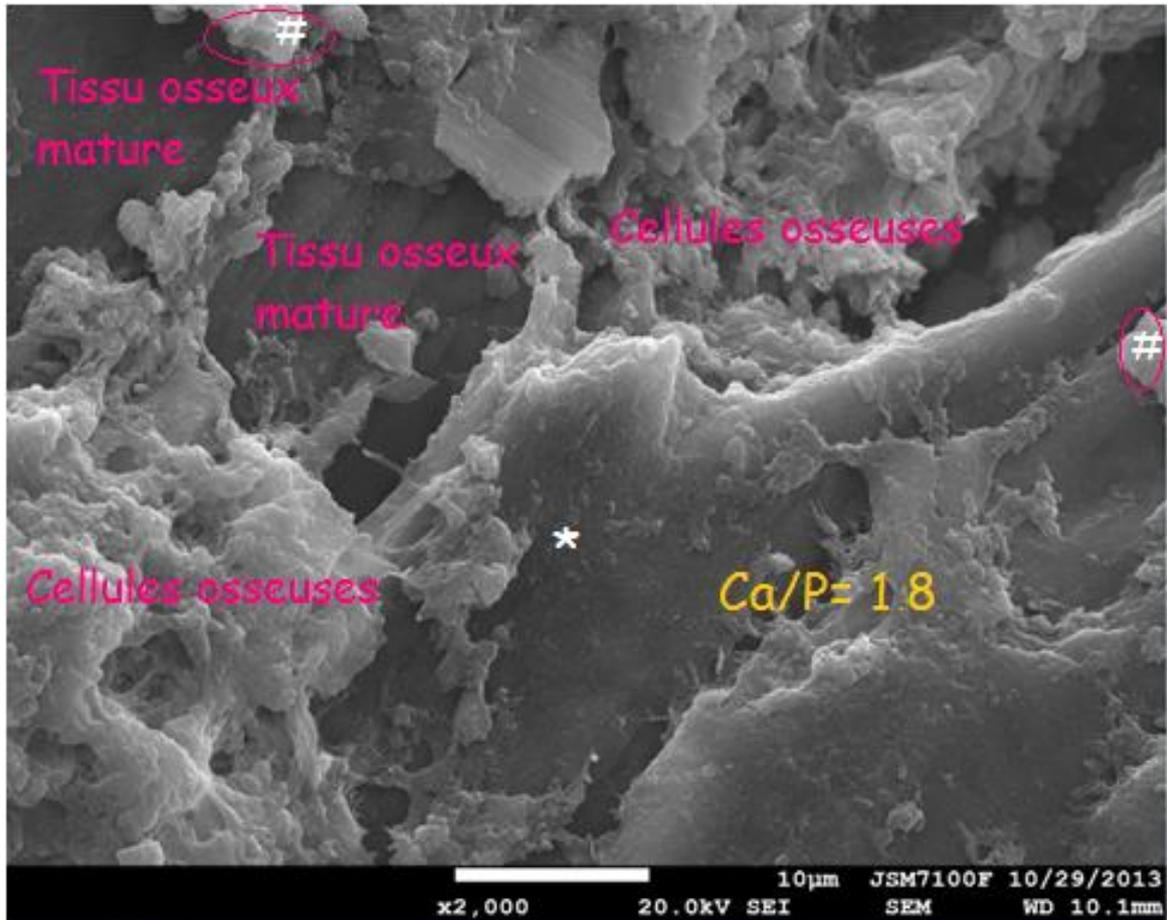


Figure 17 A : Dépôt apatitique dans les pores du verre après 1 mois de son implantation chez le groupe irradié de 1Gy,

* : Indique le dépôt apatitique

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

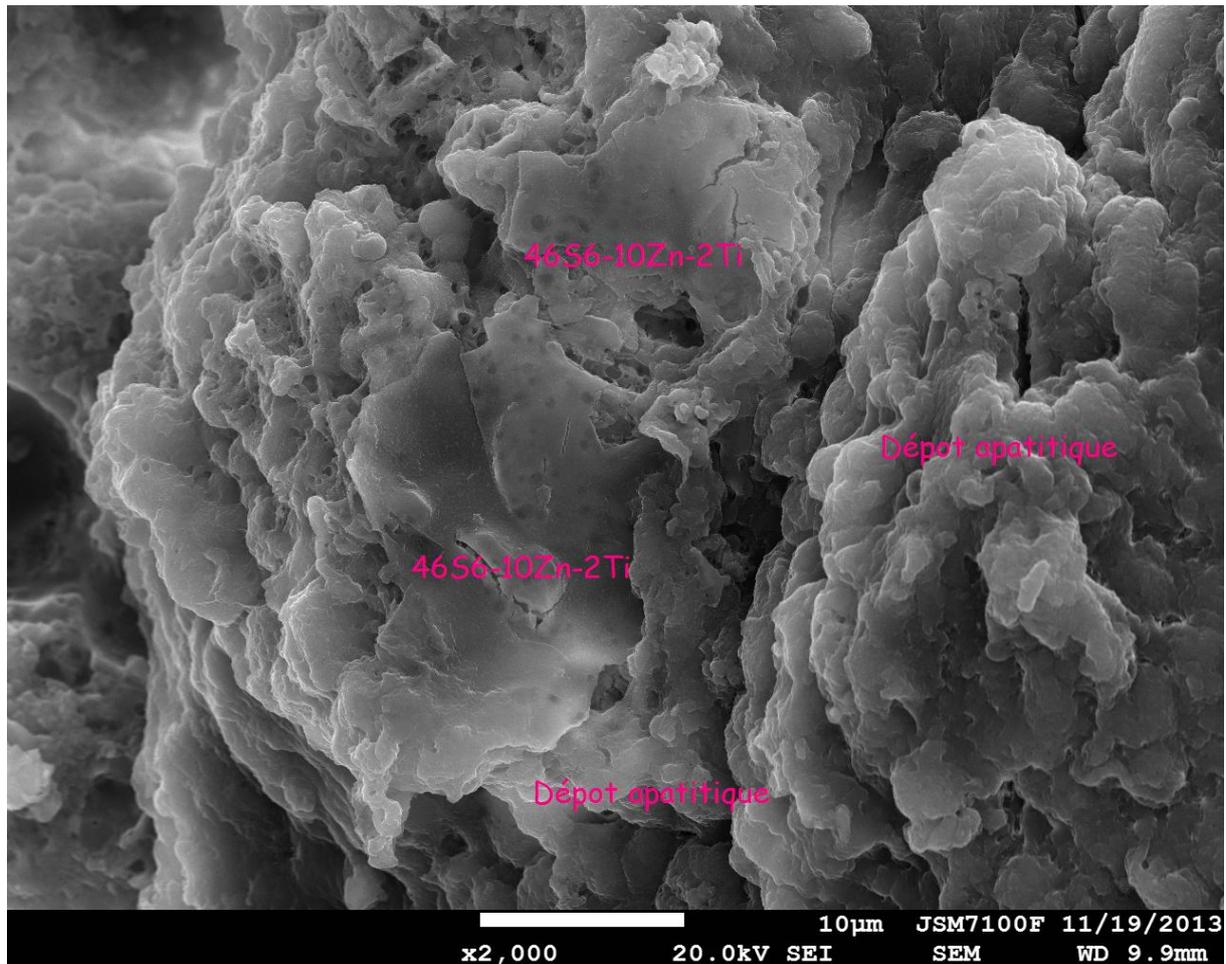


Figure 17B : Invasion des pores de la vitrocéramique par les cellules osseuses après 1 mois d'implantation chez les groupes irradiés à 2Gy

* : Indique le dépôt apatitique, # : Indique le 46S6-10Zn-NTi

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

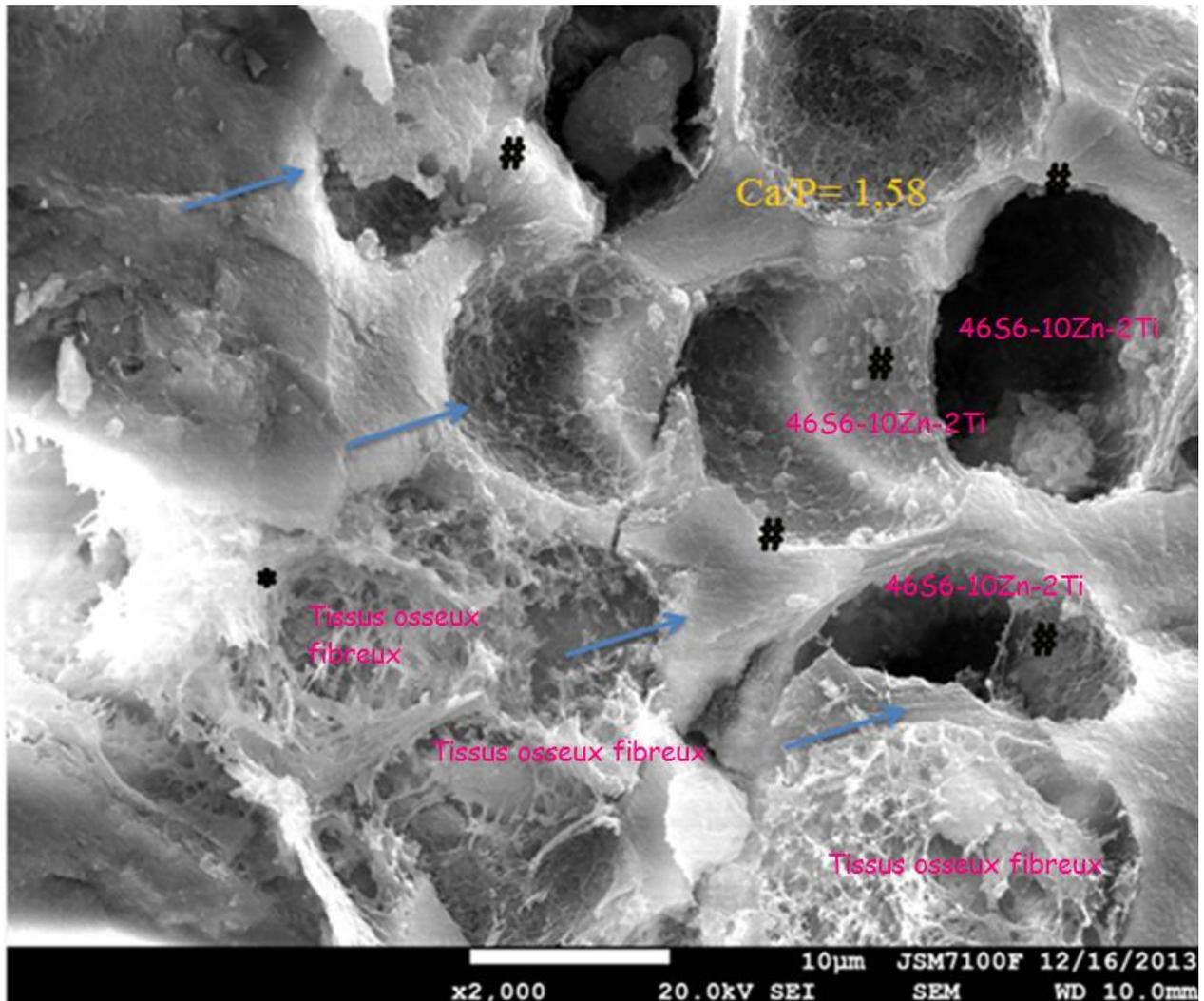


Figure 17C: Invasion des pores des verres par les cellules osseuses après 1 mois de leur implantation chez les groupes irradiés à 4Gy

* : Indique le dépôt apatitique, # : Indique le 46S6-10Zn-NTi

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

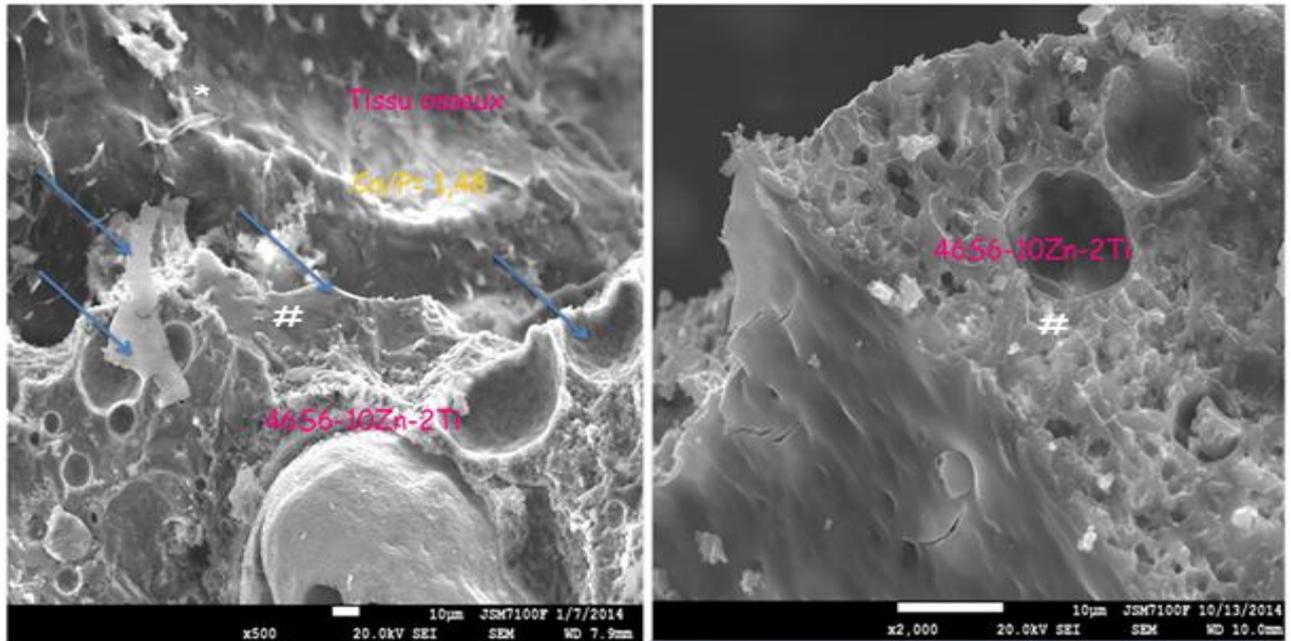


Figure 17D: Contacte intime entre le 46S6-10Zn-2Ti et le tissu osseux après implantation chez le groupe irradié à 15Gy.

* : Indique le dépôt apatitique, # : Indique le 46S6-10Zn-NTi

II-2-5- Etude du bioimplant-tissu osseux par microanalyse- spectrométrie en énergie (EDS)

La microanalyse- spectrométrie en énergie (EDS : S : spectrométrie, D : dispersion, E : énergie) permet d'obtenir la cartographie de distribution des différents éléments grâce à la rétrodiffusion des rayons X. La distribution spatiale de ces éléments dépend de la cinétique de dégradation du biomatériau d'une part et la cinétique d'ossification du tissu osseux néoformé à l'interface entre le tissu osseux et le 46S6-10Zn-2Ti d'autre part. Le rapport Ca/P est calculé pour chaque groupe. Le rapport Ca/P fournit des informations sur les processus de néoformation de tissu osseux et de dégradation des biomatériaux. Après 1 mois d'implantation du verre bioactif (46S6) chez les groupes irradiés à 1, 2, 4 et 15Gy nous remarquons une diminution du rapport phosphocalcique avec l'élévation des doses d'irradiation. En effet, ce rapport est autour de 1,55 et 1,41 chez les groupes irradiés à 1 et 2Gy illustrant ainsi la présence de triphosphate de calcium, ceci explique la capacité de 46S6 à corriger les effets délétères des faibles doses d'irradiation (1 et 2Gy). Tandis que chez les

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

groupes irradiés à 4 et 15Gy le rapport Ca/P est respectivement de l'ordre de 1,32 et 1,06, ce qui explique que ce rapport phosphocalcique (Ca/P) s'atténue avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Le 46S6 ne peut pas corriger l'effet des moyen et forte doses d'irradiation après 1 mois d'implantation. L'introduction de zinc et de titane dans la matrice de la vitrocéramique poreuse à améliorer la performance de ce composite. En effet, après 1 mois d'implantation des groupes irradiés avec 1 et 2Gy, le rapport Ca/P est respectivement autour de 1,68 et 1,55 ce qui montre ainsi la présence d'une structure apatitique à l'interface Os-46S6-10Zn2Ti. Tandis que chez les groupes irradiés avec une moyenne et une forte dose le rapport phosphocalcique est autour de 1,48 et 1,44 ce qui indique la présence d'une structure de triphosphate de calcium. Ces résultats indiquent le bon effet d'incorporation de zinc et de titane dans la matrice vitreuse de la vitrocéramique et par conséquent dans la dégradation de ce composite et la minéralisation du tissu osseux. En même temps, la concentration en zinc chez le 46S6-Os diminue avec l'augmentation de la dose d'irradiation de 12 à 10 tandis que chez le 46S6-10Zn-2Ti-os augmente de 10 à 20, ceci est expliqué par la présence de zinc dans la matrice vitreuse de la vitrocéramique (46S6-10Zn-2Ti) (Figure 18 et 19).

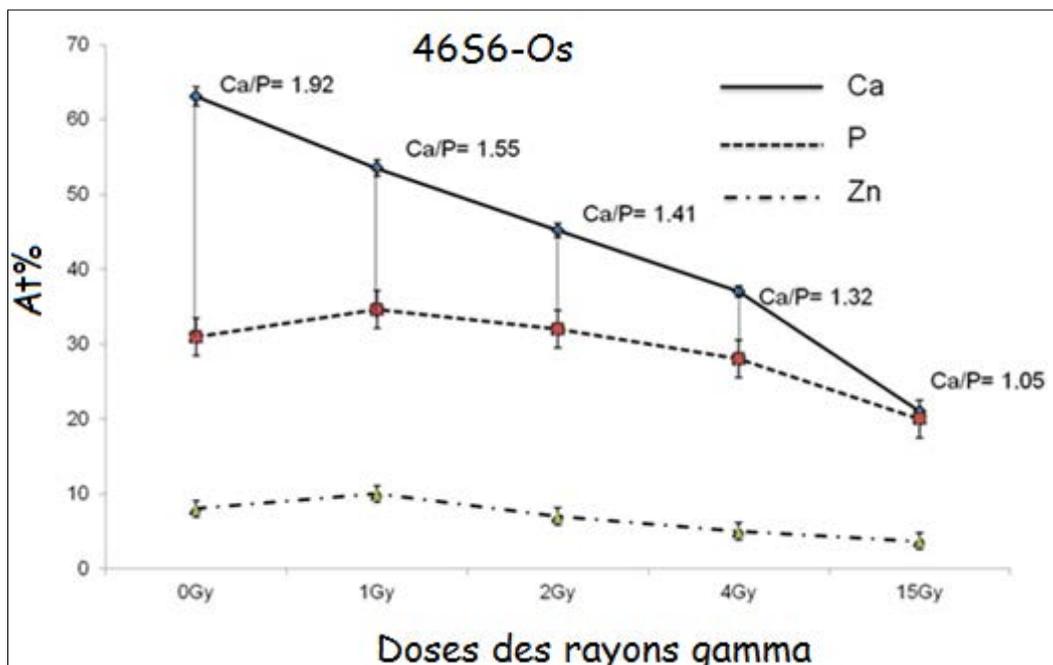


Figure 18 : Analyses quantitatives par EDS des éléments Ca, P et Zn dans l'interface implants 46S6

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

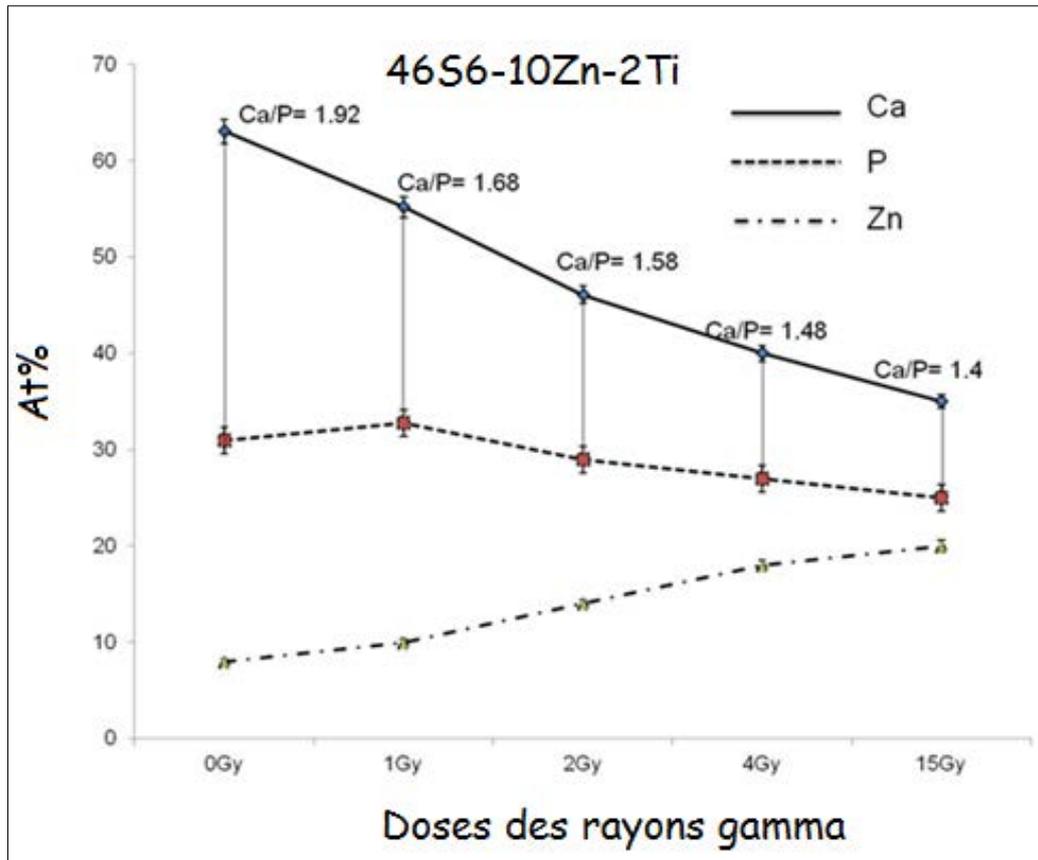


Figure 19 : Analyses quantitatives par EDS des éléments Ca, P et Zn dans l'interface implants 46S6-10Zn-2Ti.

II-2-6- Exploration par résonance magnétique nucléaire du solide (MAS-RMN) de l'interface bioimplants-os

a-Etudes par MAS-RMN du ^{13}C des implants 46S6-10Zn-2Ti après implantation

Les spectres MAS-RMN ^{13}C nous fournissent des informations sur les déplacements chimiques ainsi que sur le comportement de la matrice organique lors de la régénération et l'évolution de la minéralisation des tissus osseux après leurs implantations. En effet, le spectre des échantillons 46S6-Os 1Gy et 15Gy montrent la présence de toutes les espèces caractéristiques de la structure du collagène. Chez le groupe 46S6-Os 15Gy nous remarquons la présence des espèces Alanine β , Prolyne α et Prolyne β avec des faibles pourcentages ce qui

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

illustre ainsi que la quantité de matrice organique formée est significativement plus faible par rapport à celle chez le groupe 46S6-Os 1Gy (Figure 20).

Chez les groupes 46S6-10Zn-2Ti 1 et 15Gy montrent la présence de toutes les espèces caractéristiques du collagène. Nous remarquons aussi que ces espèces sont moins intenses chez le groupe 46S6-10Zn-2Ti15Gy, ce qui nous amène à penser que la cinétique de la néoformation du tissu osseux est inversement proportionnelle à celle de la dose de l'irradiation.

En comparant les résultats obtenus chez les groupes 46S6-Os 15Gy et 46S6-10Zn-2Ti-Os 15Gy, nous concluons que l'incorporation de zinc dans la matrice vitreuse du 46S6 a un effet important sur la capacité de néoformation du tissu osseux après leur implantation dans une zone osseuse endommagée (Figure 21)

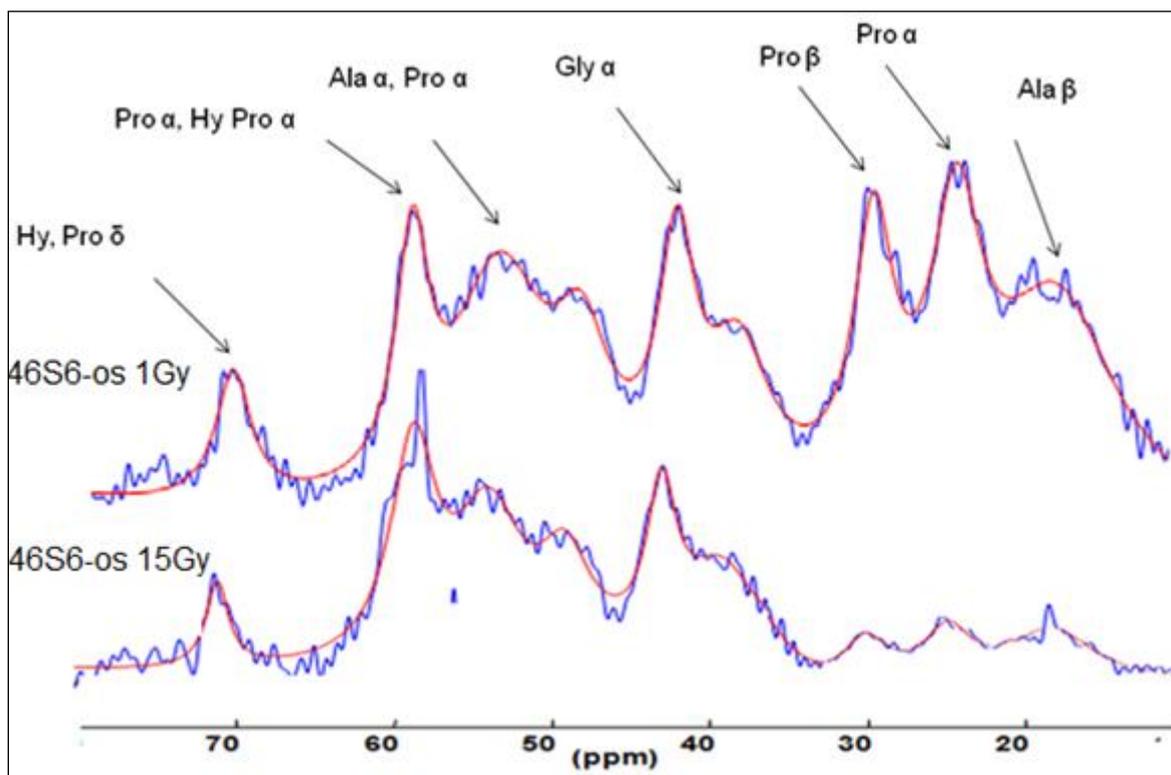


Figure 20 : Spectre MAS-RMN 31C du 46S6 après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

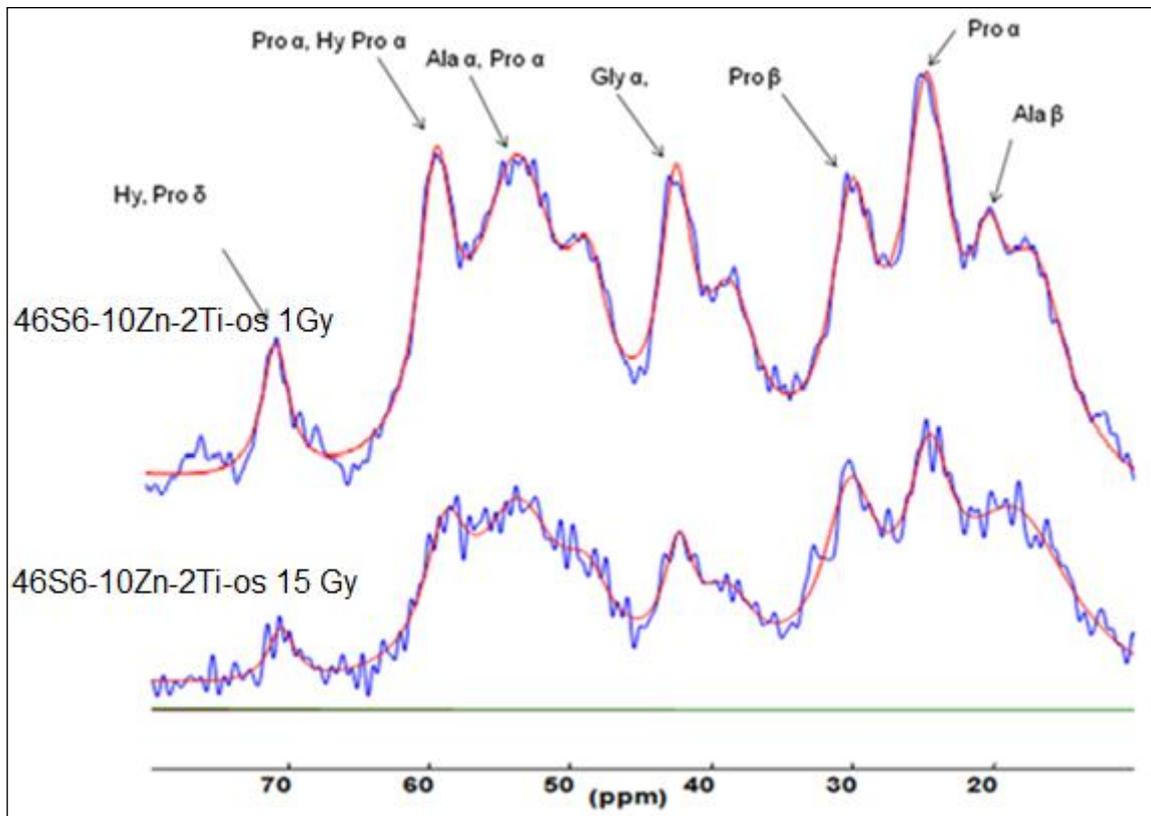


Figure 21 : Spectre MAS-RMN 31C de 46S6-10Zn-2Ti après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.

b- Evaluation par MAS-RMN du ^{31}P des implants 46S6-10Zn-2Ti après implantation

Les spectres MAS-RMN ^{31}P des implants 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti montrent la diminution de l'espèce Q_p^0 pour le 46S6 et Q_a^0 et Q_c^0 pour le 46S6-10Zn-2Ti et l'augmentation des espèces Q_{HA}^0 chez tous les groupes ce qui illustre la dégradation des bioimplants et leurs remplacements progressifs par un nouveau tissu osseux.

Chez les groupes implantés avec le 46S6 nous remarquons la présence des espèces Q_p^0 et Q_{HA}^0 chez les groupes irradiés à 1Gy et 15Gy respectivement avec des pourcentages (7%), (92%) et (20%) et (80%). Ce résultat explique l'avancement de la dégradation du 46S6 et la formation de l'hydroxyapatite chez les groupes irradiés à 1Gy, en effet nous concluons un

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

transfert de Q_p^0 en faveur de Q_{HA}^0 , expliquant ainsi la dissolution du phosphore de la matrice du verre bioactif et leur participation dans la formation de l'hydroxyapatite biologique qui cristallise dans un système hexagonal (Figure 22).

Les groupes implantés avec la vitrocéramique poreuse (46S6-10Zn-2Ti) montrent la présence de ces deux espèces Q_C^0 et Q_{HA}^0 chez les groupes irradiés à 1Gy et 15Gy respectivement avec les pourcentages suivants (0), (100%) et (20%), (80%) ce qui indique l'avancement de la dissolution de 46S6-10Zn-2Ti chez les groupes irradiés à 1Gy (Figure 23).

On peut conclure que la dissolution de 46S6-10Zn-2Ti et sa participation dans la formation de la matrice organique sont plus rapides et plus importants comparativement aux autres groupes qui sont implantés avec le 46S6. Ces données illustrent le bon effet d'incorporation de zinc dans la matrice vitreuse de notre composite 46S6-10Zn-2Ti.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des ratte irradiées aux rayons gamma

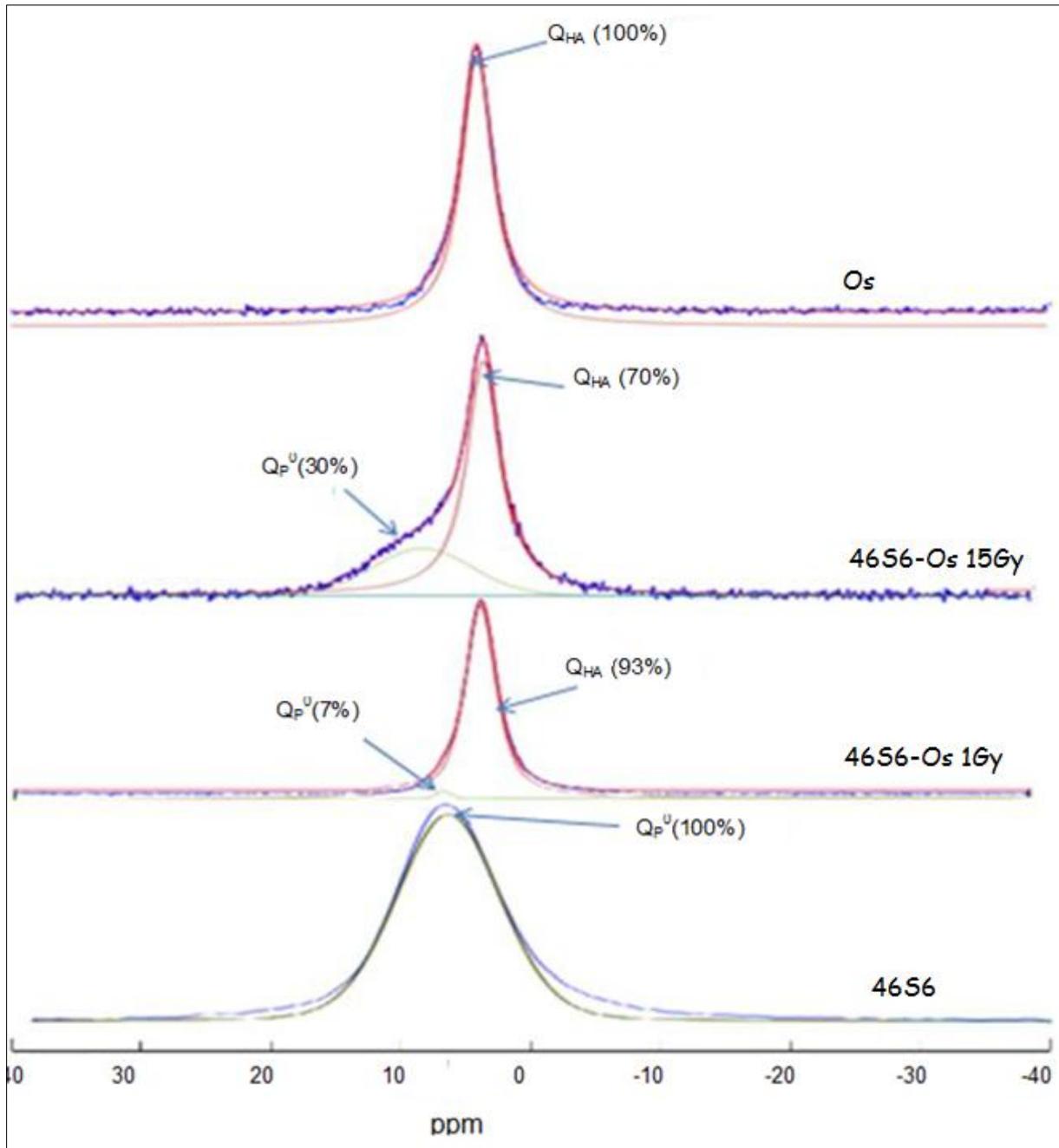


Figure 22 : Spectre MAS-RMN ^{29}P du 46S6 après implantation chez des ratte irradiées à 1 et 15Gy.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

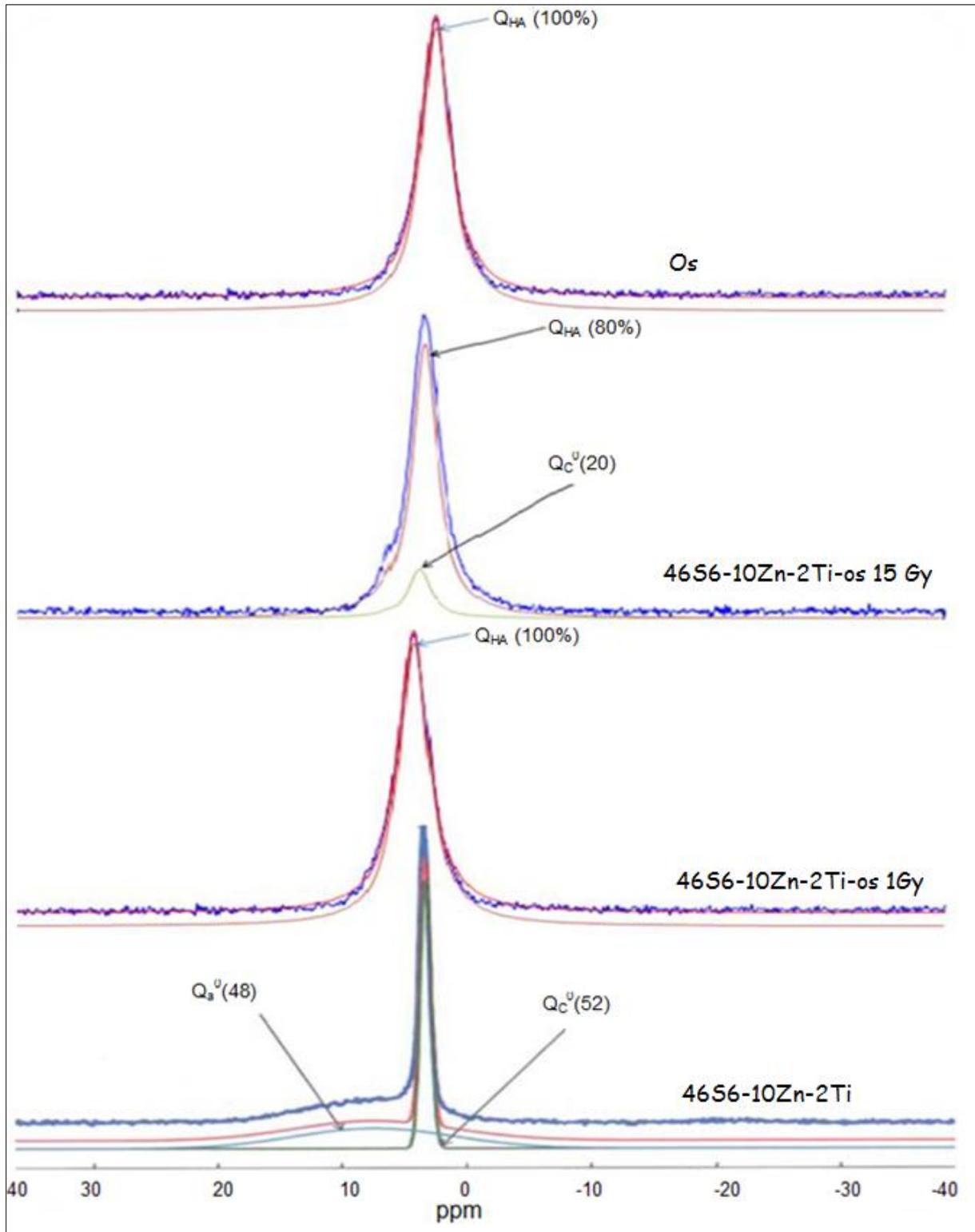


Figure 23: Spectre MAS-RMN ^{29}P de la 46S6-10Zn-2Ti après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

c- Analyse par MAS-RMN ^{29}Si des implants 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti après implantation

Les spectres déconvolués MAS-RMN ^{29}Si des implants 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti avant et après 1 mois d'implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy sont présentés par les figures 24 et 25.

Le spectre ^{29}Si du 46S6 chez les groupes irradiés à 1Gy ne montre aucun signal ce qui montre l'absence de ce noyaux dans notre échantillons 46S6-os. Et comme il est connu que les verres bioactifs sont des composés à base de silice, nous concluons que notre biomatériau est presque totalement dissout et remplacé par l'HA biologique. Alors que chez le groupe 46S6 15Gy le spectre ^{29}Si montre la diminution des espèces Q^2 et Q^3 et son remplacement par une espèce Q^4 , ce qui illustre la formation d'une couche riche en silice à la surface du biomatériau. Cette couche représente un environnement favorable pour la déposition de dépôt apatitique.

Les spectres ^{29}Si du 46S6 -10Zn-2Ti chez les groupes 46S6-10Zn-2Ti1 et 15Gy ne montrent aucun signal de silicium ce qui illustre la dégradation du bioimplant et réapparition d'un nouveau tissu osseux.

En comparant les résultats obtenus après l'implantation de 46S6 et 46S6-10Zn-2Ti on conclut que l'incorporation de zinc et de titane et la présence des pores ont maximisé la dissolution de la matrice vitreuse de 46S6-10Zn-2Ti et accentué sa performance à la formation de l'apatite biologique et par conséquent la restauration de l'effet de l'irradiation sur la trame osseuse.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

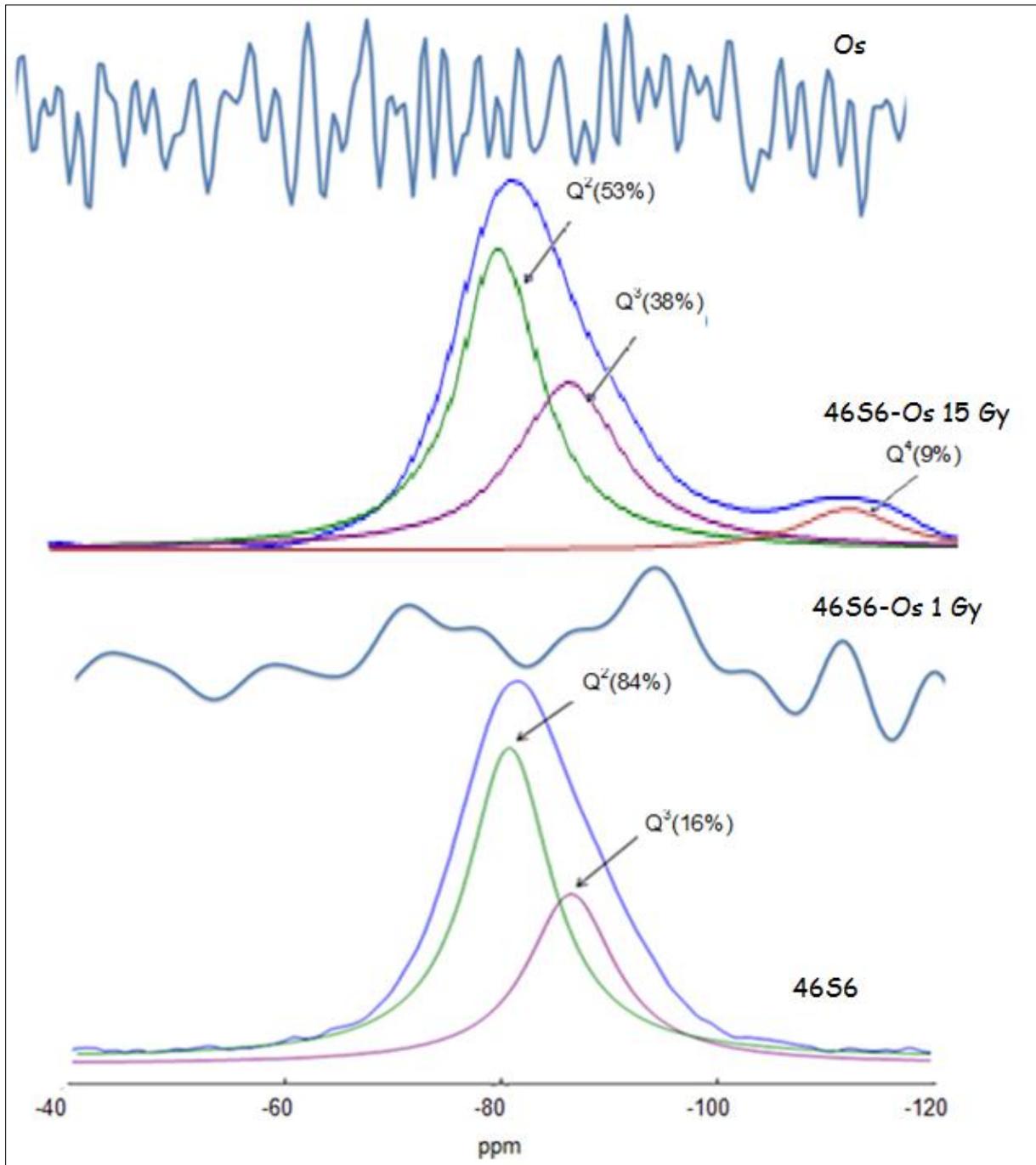


Figure 24: Spectre MAS-RMN ^{29}Si du 46S6 avant et après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy.

Partie3: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

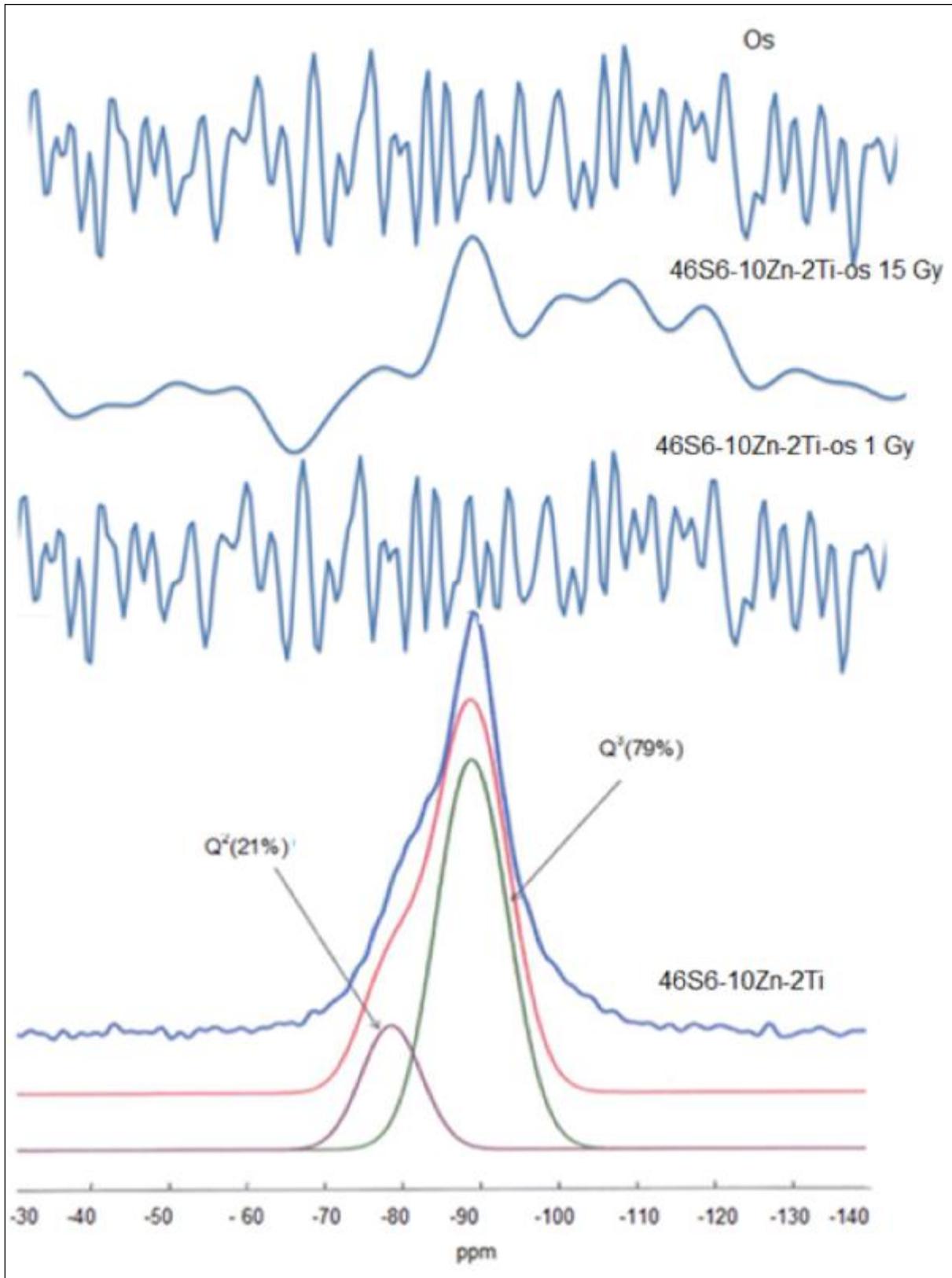


Figure 25: Spectre MAS-RMN 29Si du 46S6-10Zn-2Ti avant et après implantation chez des rattes irradiées à 1 et 15Gy

III-Discussion

L'incorporation de 10% d'Oxyde de Zinc (ZnO) et 2% de Nitrure de Titane (NTi) dans la matrice de la vitrocéramique poreuse (46S6-10Zn-2Ti) suite à un traitement thermique du verre bioactif dopé au zinc. Le verre bioactif dopé au zinc qu'est préparé dans le système quaternaire $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ augmente la capacité de la prolifération cellulaire par rapport au verre 46S6 pur. Après implantation de n'importe quels biomatériaux le tissu se traumatise après l'opération [Mikos *et al*, 1998]. La réaction inflammatoire peut varier selon le tissu ou l'organe concerné [Henson *et al*, 2007]. En effet, le bioimplant est considéré comme étant un élément étranger pour le corps (antigène), ce qui conduit à la création de plusieurs réactions entre le corps et le bioimplant. Ce processus fait intervenir plusieurs cellules (les macrophages et les lymphocytes T et B). Après implantation avec la vitrocéramique poreuse nous notons l'absence d'inflammation, ceci est dûe à la présence de zinc comme un élément dopant dans notre composite 46S6-10Zn2Ti, possédant ainsi un rôle immunitaire [Ananda *et al*, 2009]. L'étude macroscopique ne montre ni phénomène de fibrose ni signe de toxicité illustrant ainsi le rôle de notre composite dans les processus de cicatrisation.

L'irradiation des rattes à différentes doses des rayons gamma (1, 2, 4 et 15Gy) provoque la destruction des trabécules osseuses et le déséquilibre de la balance oxydative. Depuis plus de 30 ans, il est établi que l'irradiation thérapeutique osseuse chez l'enfant entraîne des retards de croissance staturo-pondérale par la diminution de la croissance squelettique [Robert *et al*, 1975]. La diminution de l'activité des ostéoblastes débute à partir de 4Gy [Dare *et al*, 1997] se traduit par une diminution de la synthèse de la matrice extracellulaire. L'étude *in vitro* de cellules de type ostéoblastiques murines (MC3T3-E1) soumises à des doses variables de radiations ionisantes (de 1 à 6 Gy) a permis de démontrer à la fois une diminution de la synthèse du collagène et du Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) [Dudziak *et al*, 2007]. Les propriétés de réparation de l'os peuvent être considérées comme diminuées après exposition à des radiations ionisantes [Pelker *et al*, 1993]. L'implantation de 46S6-10Zn-2Ti conduit à la restauration des effets délétères de l'irradiation. En effet, l'implantation de 46S6-10Zn-2Ti a stabilisé les taux sériques de phosphatase alcaline. Parmi les enzymes associées à la différenciation ostéoblastique, la phosphatase alcaline qui est responsable du clivage des liaisons organophosphorées qui libère le phosphate inorganique dans le milieu. Elle participe vraisemblablement au processus de

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

minéralisation. Elle est localisée dans la membrane plasmique des ostéoblastes et son site actif est accessible à partir de la surface extracellulaire. Elle est également libérée dans la circulation sanguine et l'augmentation de sa concentration sérique est un marqueur de l'activité ostéoblastique. L'implantation de la vitrocéramique a restauré la balance du stress oxydant. En effet nous remarquons l'atténuation des valeurs du MDA et une augmentation des teneurs du CAT, SOD et GPx. Le zinc est connu comme étant un élément antioxydant. Sa déficience induit l'augmentation et la surproduction du stress oxydant, conduisant à l'oxydation lipidique, protéique et de l'ADN [Prasad 2009]. Le zinc est connu comme étant un antioxydant qui réduit la formation et la production des radicaux libres par le biais de plusieurs moyens [Prasad 2009].

Après implantation des rattes irradiées à différentes doses d'ionisation, la diffraction des rayons X montre l'évaluation et le changement des systèmes de cristallisation du bioimplant. Ce changement est lié au système de cristallisation du verre amorphe facilitant ainsi l'échange des éléments chimiques avec l'environnement biologique voisinant au cours d'implantation et la stimulation et la production des réactions de bioactivité et de réactivité [Hallab *et al*, 2005]. Le verre bioactif est un ostéopromotif possédant une surface active. Cette surface favorise la formation d'une couche d'apatite sur la couche de SiO₂ au cours des échanges avec les milieux biologiques [Silber *et al*, 2003]. Cette surface est reconnue par le corps comme étant un lien avec le bioimplant et commence à déposer de l'os sur cette couche [Ogino *et al*, 1980]. Il a été mis en évidence que les réactions de bioactivité produite à l'interface os-biomatériaux conduit à la libération des concentrations critiquables solubles de Si, Ca et P aboutissant ainsi à des réponses intra et extracellulaires conduisant a une formation osseuse très rapide [Hench *et al*, 1998]. La cristallisation la plus importante est observée chez les groupes implantés avec le 46S6-10Zn2Ti par comparaison avec les autres qui sont implantés avec le 46S6. Le zinc augmente la quantité des protéines, la quantité de calcium et l'activité de la phosphatase alcaline dans l'os *in vitro* et *in vivo* [Yamaguchi *et al* 1988]. L'administration des rattes avec des faibles doses de zinc augmente l'activité de la phosphatase alcaline et la quantité d'ADN dans le tissu osseux [Yamaguchi *et al*, 1986]. Les résultats rapportés par l'infrarouge ont mis en relief le rôle du bioimplant dans la correction de l'effet de l'irradiation par le développement et la réapparition des bandes d'hydroxyapatite biologique. Ce résultat illustre ainsi le rôle de zinc dans la formation, le développement et la

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

différenciation des ostéoblastes et inhibe la formation et la prolifération des ostéoclastes induisant ainsi la formation et la minéralisation du tissu osseux [Hall *et al*, 1999]. Le dosage de certains éléments chimiques majeurs et traces au niveau des échantillons os- bioimplant montre une faible modification de la concentration du phosphore P. La concentration de calcium Ca et le rapport Ca/P augmentent chez les groupes implantés avec le 46S6-10Zn2Ti, ceci explique bien le rôle du zinc dans la minéralisation du tissu osseux. En effet le Ca est un indicateur de la minéralisation et un marqueur de maturation des cellules ostéoblastiques [Ito *et al*, 2005]. La différence du rapport Ca/P entre les groupes implantés avec le 46S6-10Zn2Ti et le 46S6 explique bien la présence de la bonne qualité d'hydroxyapatite chez les groupes implantés avec le 46S6-10Zn2Ti. Il a été démontré que le Zn, qui est présent sous forme d'élément à l'état de trace dans l'os, a un important effet dans l'activation de la formation et la calcification du tissu osseux *in vitro* [Yamaguchi *et al*, 1986] et *in vivo* [Yamaguchi *et al*, 1986]. L'effet de zinc est basé sur la stimulation des protéines du tissu osseux aboutissant à la synthèse des cellules osseuses [Yamaguchi *et al*, 1988]. Nous remarquons aussi la diminution des taux de Zn et l'augmentation des taux de silicium (Si) chez les groupes irradiés et implantés avec le 46S6-10Zn-2Ti, ceci explique alors la faible biodégradabilité du bioimplant. Les résultats rapportés par la microscopie à balayage électronique (MEB) montrent l'attachement et l'ostéointégration du dépôt apatitique dans les pores du 46S6-10Zn-2Ti chez les groupes irradiés à 1et 2Gy, ceci illustre d'une part le rôle de zinc dans la différenciation ostéoblastique et l'importance de la porosité qui favorise la néo vascularisation et la prolifération ostéoblastique d'autre part. Les analyses par MAS-RMN des spectres du ²⁹Si permettent de mieux comprendre la réactivité chimique de la matrice vitreuse des verres bioactifs 46S6 après leurs implantations *in vivo*. Notre étude confirme l'émergence d'une nouvelle composante Q⁴ caractéristique de la dissolution du réseau vitreux du verre bioactif 46S6 après implantation au niveau du condyle fémoral. L'apparition de la composante Q⁴ (pic d'intensité faible) est un témoin de la formation d'une couche riche en silice (SiO₂) à la surface du verre bioactif 46S6 lors d'expérimentations *in vivo*. Chez les groupes implantés avec le 46S6-10Zn-2Ti, les spectres ²⁹Si ne montrent aucun signal ce qui illustre la dégradation du bioimplant et son remplacement par l'os. Les spectres MAS-RMN ³¹P ont été exploités dans notre étude pour la détermination de la biominéralisation, c'est à dire la formation d'apatite biologique de l'os après implantation des deux implants osseux. Ils montrent l'apparition progressive d'une nouvelle composante en phosphate Q_{HA}⁰ qui est une

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

caractéristique de la couche d'hydroxyapatite carbonatée. Ces résultats indiquent que les cristaux qui composent l'os tendent vers une apatite plus stable. D'autre part, le spectre ^{13}C RMN de l'os est comparable avec des spectres déjà publiés [Penk *et al*, 2012]. Il montre des pics caractéristiques de collagène. Ce résultat est une confirmation que le collagène a été formé en présence de composite 46S6-10Zn-2Ti, dans le cadre de la régénération de la matrice organique osseuse.

L'effet thérapeutique de notre composite 46S6-10Zn-2Ti a été amélioré par la présence d'une porosité hétérogène (des macropores et des micropores et des pores profonds de tailles variées laissant apparaitre une porosité ouverte et probablement en intercommunication) [Wers *et al*, 2014]. En effet, cette porosité favorise la prolifération et l'ostéointégration des cellules osseuses et la dégradation et la résorption du 46S6-10Zn-2Ti et son remplacement par le tissu osseux.

IV-Conclusion

*L'irradiation à différentes doses des rattes *Wistar* a créé un état de déséquilibre oxydatif au niveau osseux et une altération architecturale de la trame osseuse.

* L'administration des verres 46S6 et de la vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane 46S6-10Zn2Ti au niveau du condyle fémoral induit la correction de l'effet délétère de ces derniers.

L'irradiation avec 1, 2, 4 et 15Gy induit la perturbation de certains paramètres biochimiques et oxydatifs SOD, CAT, GPx et TBARS. Ceci confirme une production excessive des radicaux libres au niveau osseux.

L'implantation avec le 46S6 et le 46S6-10Zn-2Ti semble corriger l'effet délétère de l'irradiation :

Après 30 jours, les verres 46S6-10Zn-2Ti ont apporté des effets bénéfiques pour le rétablissement de la balance oxydative.

* A partir de 30 jours d'implantation, ce biomatériau favorise une meilleure ostéointégration osseuse. La microscopie électronique apporte une information qualitative sur la transformation du verre en un os mature.

Partie3:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application chez des rattes irradiées aux rayons gamma

Dans le cas de l'ostéoporose, il convient d'utiliser le 46S6-10Zn-2Ti qui permet la différenciation ostéoblastique de cellules progénitrices assurant ainsi l'ostéogénèse dans l'ensemble du verre.

* Les études physico-chimiques par DRX, FTIR, ICP-OES et RMN ont montré une maturation osseuse sans une altération des profils minéraux

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

I-Introduction

Les pertes de substances osseuses sont d'origines variables, elles se caractérisent par une difficulté voire à une impossibilité à cicatrifier de façon autonome. Elles nécessitent donc l'intervention d'un chirurgien pour les réduire.

Il existe de nombreuses origines aux pertes de substances osseuses, il peut s'agir de pertes d'origine traumatique, à la faveur de fractures ouvertes ou non, associées à des lésions tissulaires étendues susceptibles de déterminer la dévitalisation d'un segment entier de diaphyse [Tielinen *et al*, 2007]. La perte de substance peut aussi être consécutive à une résection oncologique [Campanacci *et al*, 1996], ou encore à une correction orthopédique lors de défauts de croissance chez le jeune [Winkler *et al*, 1996]. Pour corriger ces pertes osseuses les scientifiques ont fait recours à l'utilisation des substituts osseux. L'effet de ces substituts peut être amélioré et adopté au patient par l'introduction des éléments chimiques dopants ou de molécules organiques. Pour notre étude nous avons adopté le dopage avec le zinc et le titane et la création des pores. Le zinc jou un rôle important dans la multiplication cellulaire de l'os ainsi que la fabrication de collagène de la trame osseuse [Dickey *et al*, 2013]. Le zinc pourrait contribuer également à l'amélioration de la densité minérale des os en cas d'ostéoporose [Tokudome *et al*, 2012]. Aussi, l'os adhère spontanément au titane. La présence des pores permet une bonne invasion tissulaire [Diaye *et al*, 2013].

II-Résultats

II-1- Etude biologique

II-1-1- Suivi clinique

L'évaluation clinique a été réalisée en tenant compte de plusieurs paramètres liés à l'animal implanté : le suivi des poids, température corporelle et la cicatrisation des plaies.

Après l'opération chirurgicale le lapin perd du poids surtout dans les premiers jours. En même temps nous remarquons que cette perte est accompagnée par une augmentation

Partie4:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

énorme de la température liée à la cicatrisation. Vers la deuxième semaine, nous remarquons la cicatrisation du tissu traumatisé et ceci est accompagné par le rétablissement des températures et des poids. Après 4 semaines, la cicatrisation complète des plaies est observée et l'animal revient à son état normal.

II-1-2- Evaluation macroscopique

Aucune complication post opératoire n'a été détectée chez les groupes implantés après 1, 4 et 9 mois. L'étude macroscopique montre la guérison homogène de tous les groupes implantés avec un revêtement osseux autour du bloc poreux du bioimplant. Nous remarquons ainsi la progression de la formation et le remodelage du tissu osseux avec le temps d'implantation. En effet, après 1 mois d'implantation, nous observons seulement l'attachement entre l'os et le 46S6-10Zn-2Ti et le début de formation du tissu osseux néoformé noté par l'apparition d'une couche très fine et qui commence à entourer le bioimplant. Après 4 mois, les processus de dégradation, de résorption et d'ostéointégration du bioimplant ont augmenté ce qui conduit à la progression de la formation du tissu osseux. Alors qu'après 9 mois, le biomatériau a presque totalement disparu et remplacé par le tissu osseux (Figure 1).

Partie4:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)



Figure 1 : Etude macroscopique de l'interface os-46S6-10Zn2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation.

II-1-3 Suivi radiologique

Partie4:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

a-Rayon -X

Le suivi radiologique commence au premier jour d'implantation avec un cliché post chirurgical. Il permet de vérifier le bon positionnement de l'implant (Figure 2A).

Après 1 mois d'implantation, nous remarquons l'absence de liseré entre le bioimplant et l'os, après 4 mois nous notons la présence des phénomènes de corticalisation, l'absence de liseré et le début de résorption du 46S6-10Zn-2Ti (Figure 2B et C). Finalement, après 9 mois d'implantation nous observons la formation d'une cal périostée accompagnée par une résorption quasi-totale du 46S6-10Zn₂Ti et son remplacement par le tissu osseux (Figure 2D).

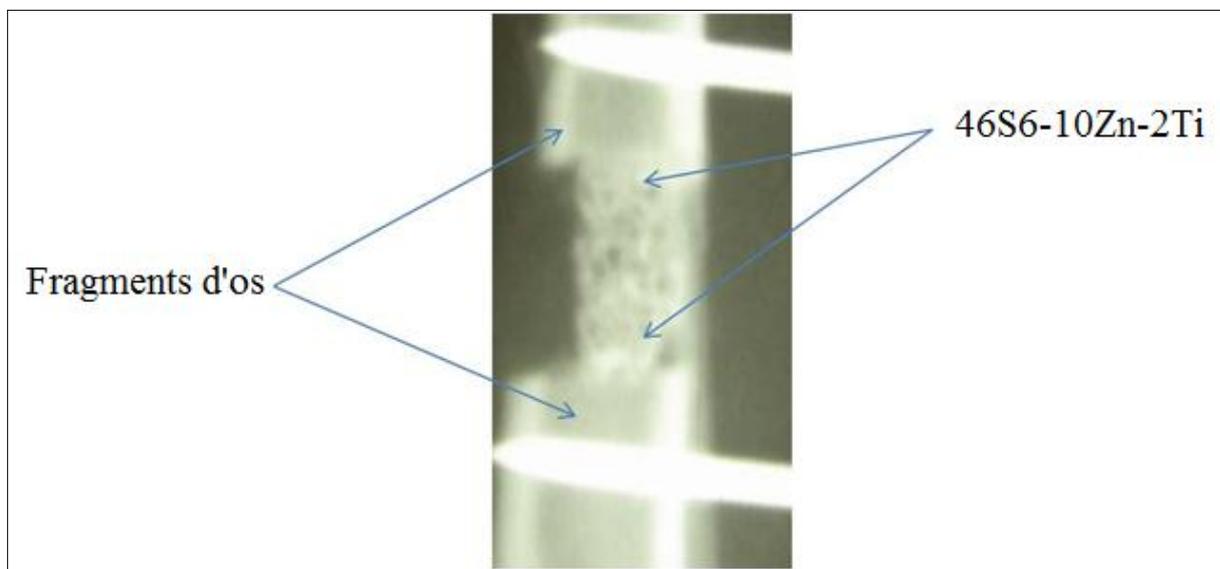


Figure 2A : Radiographie postopératoire

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

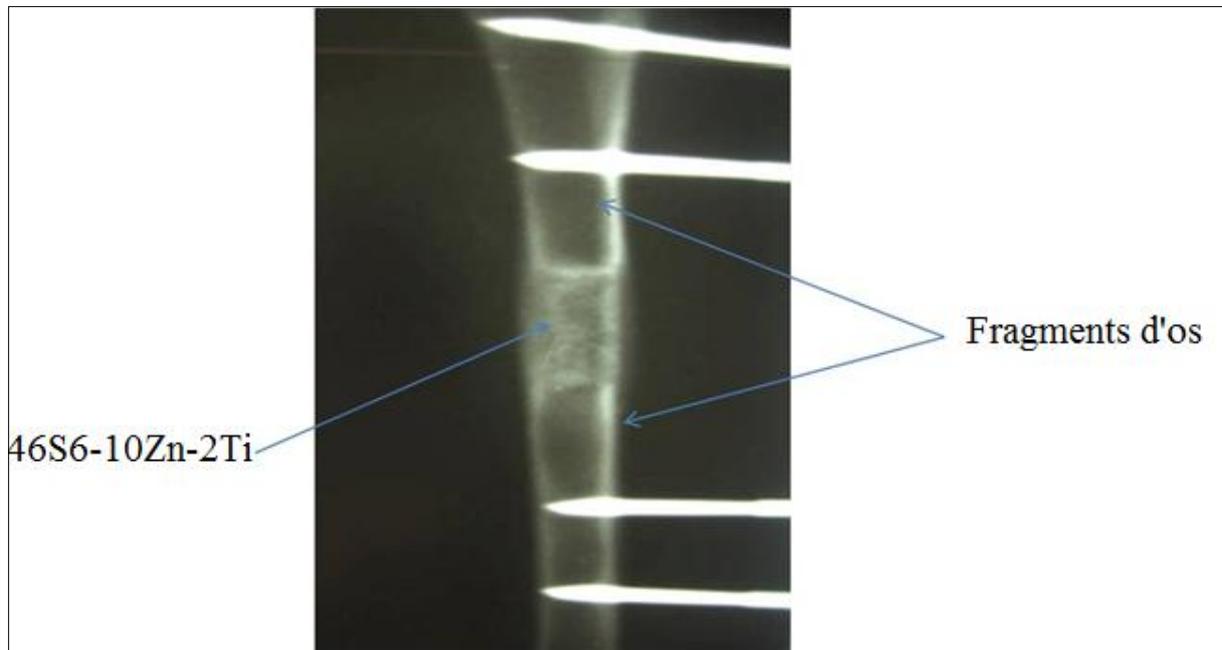


Figure 2B: Radiographie après 1 mois d'implantation

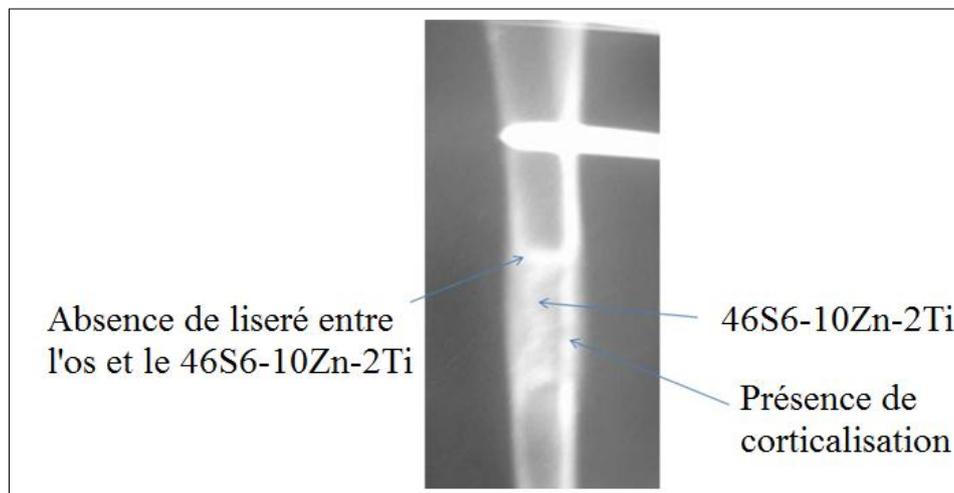


Figure 2C: Radiographie après 4 mois d'implantation

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

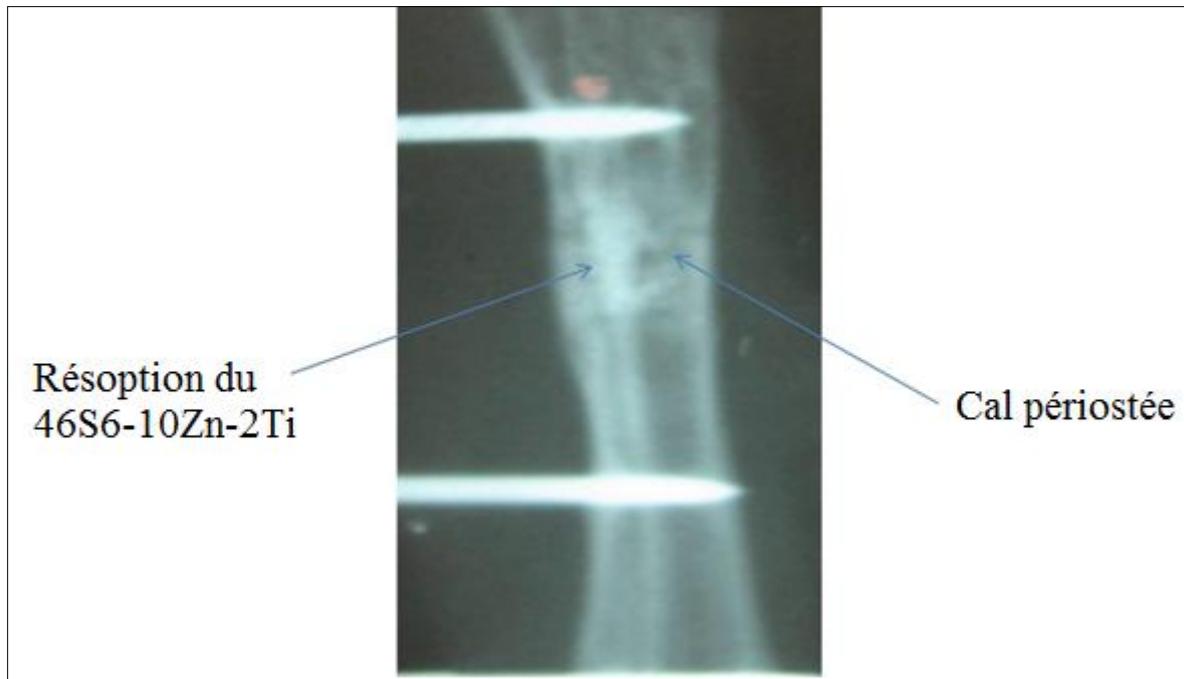


Figure 2D : Radiographie après 9 mois d'implantation

b- Scanner (CT)

Les résultats rapportés par le scanner sont en accord avec les résultats signalés par les rayon- X. En effet, après 1 mois d'implantation nous remarquons un lien de surface os-46S6-10Zn-2Ti (Figure 3A). Après 4 mois nous observons la corticalisation du bioimplant et le début de résorption du 46S6-10Zn-2Ti et son remplacement par le tissu osseux (Figure 3B). Après 9 mois, nous notons la formation d'une cal périostée accompagnée par la progression de la dégradation du 46S6-10Zn-2Ti et son remplacement par l'os néoformé (Figure 3C).

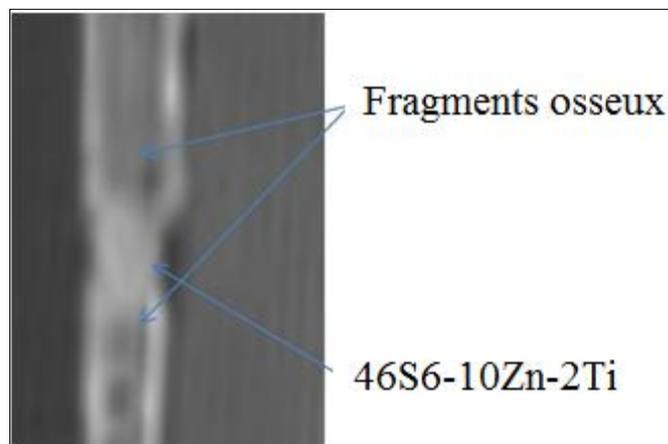


Figure 3A: CT après 1 mois d'implantation

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

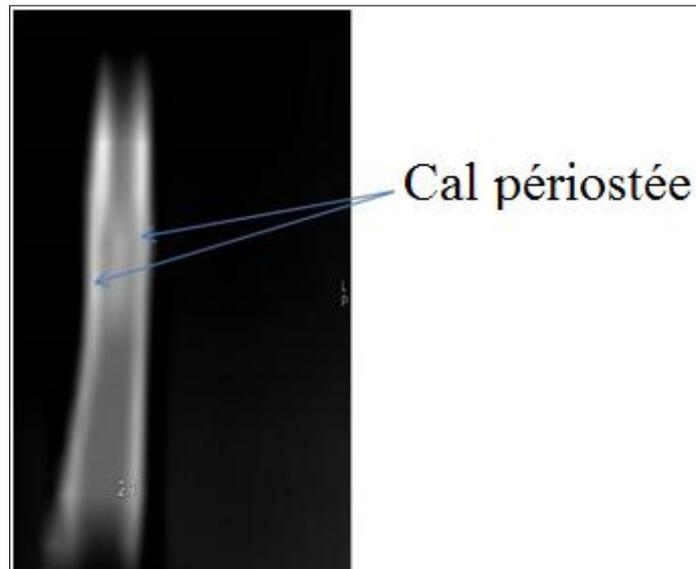


Figure 3B: CT après 4 mois d'implantation

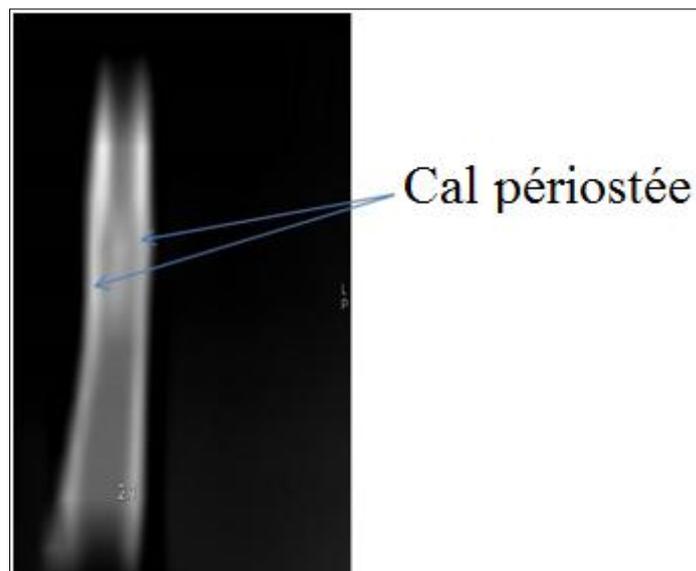


Figure 3C : CT après 9 mois d'implantation montrant la corticalisation du cal et le remodelage osseux

c- Microscanner (mCT)

L'étude micro architecturale par la microdensitométrie osseuse a montré non seulement un excellent lien de surface os-implant, mais aussi une intégration osseuse importante à travers les multiples pores du verre bioactif avec un début de résorption de

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

l'implant particulièrement après 4 mois d'évolution et son remplacement par l'os néoformé (Figure 4A, B, C).

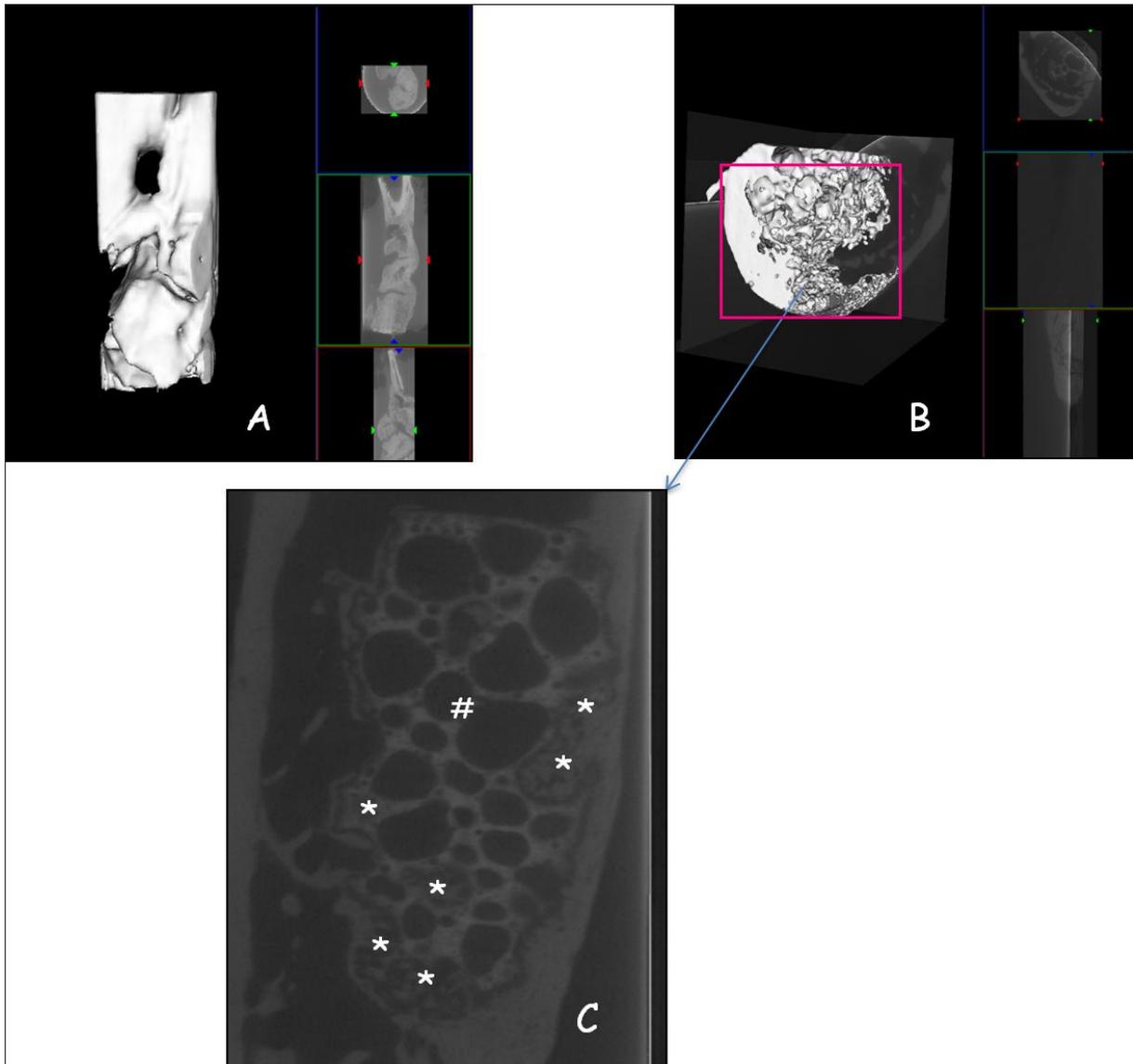


Figure 4: mCT après 4 mois d'implantation : groupe non implanté (A) et groupe implanté (B et C)

II-1-4- Etude histologique

Partie4:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

Trichrome de Goldner

L'observation histologique d'une cal osseuse développée sur un bloc d'une vitrocéramique poreuse dopée au Zn et au Ti au niveau du tibia durant une période de 9 mois a permet de montrer une ossification endoconjonctive. En éffet, après 1 mois (Figure 5B), nous remarquons un contact intime entre le biomatériau et le tissu osseux minéralisé ce qui explique la biocompatibilité et la réactivité chimique de notre biomatériau. Nous remarquons aussi l'absence des phénomènes de fibroses ce qui explique la non toxicité de notre biomatériau. Nous distinguons 2 zones : une zone périphérique colonisée par un os primaire anarchique. Dans cette zone un manchon d'os immature (woven bone), composé de travées homogènes s'accroissent vers le centre. Une deuxième zone colonisée par le 46S6-10Zn-2Ti. Nous observons dans cette zone l'émergence de certaines cellules ostéoblastiques à partir du tissu osseux. Après 4 mois (Figure 5C) nous remarquons l'intégration du tissu osseux minéralisé au niveau des pores du biomatériau et la formation d'un réseau interconnecté entre eux. En éffet ce réseau est formé à partir des cellules mésenchymateuses, qui vont se transformer en fibroblastes contenues dans des bandes de collagène et qui sont déposés avec une orientation apparente. Les fibroblastes se sont métamorphosés en ostéoblastes actifs qui sont allongées le long de travées de tissu osseux minéralisé. L'ossification s'est mise en place de proche en proche de la périphérie vers le centre et donc de façon centrifuge. Le tissu osseux nouvellement formé parait de type immature non lamellaire. Nous remarquons aussi la présence d'un tissu fibrocartillagineux qui se mélange avec le reste du 46S6-10Zn-2Ti, ceci représente un premier signe de la néo synthèse. La multiplication cellulaire était intense avec apparition de la substance ostéοide qui se déposait progressivement sur les travées osseuses anastomosées. Après 9 mois nous avons observé un os cortical néοformé en cours d'élaboration qui commence à apprendre l'aspect de la structure haversienne. Par ailleurs, nous avons remarqué aussi la présence d'un tissu fibroadipeux et la persistance des travées osseuses. Nous signalons aussi la présence des restes des chondrocytes (Figure 5D).

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

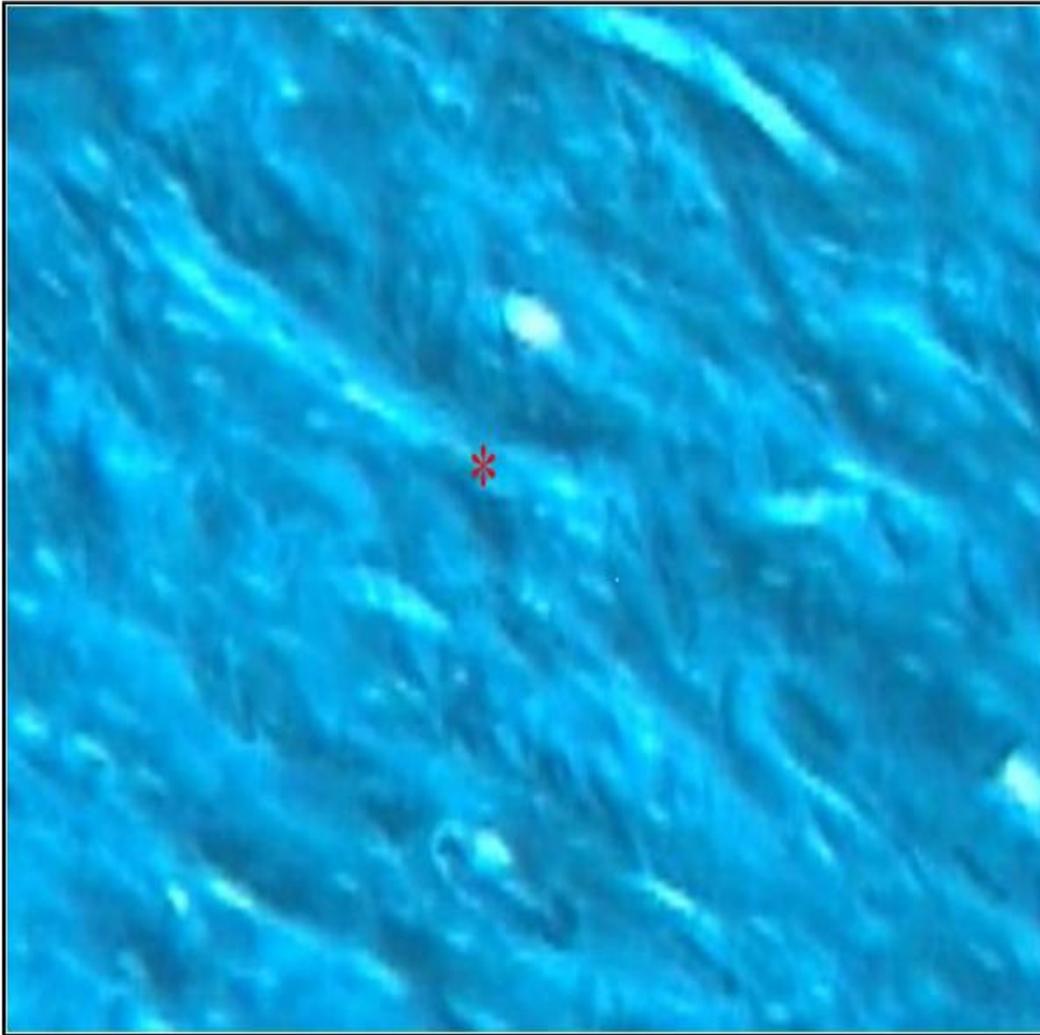


Figure 5A: coupe histologique du tissu osseux du groupe de control (Coloration de Goldner's trichrome)

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

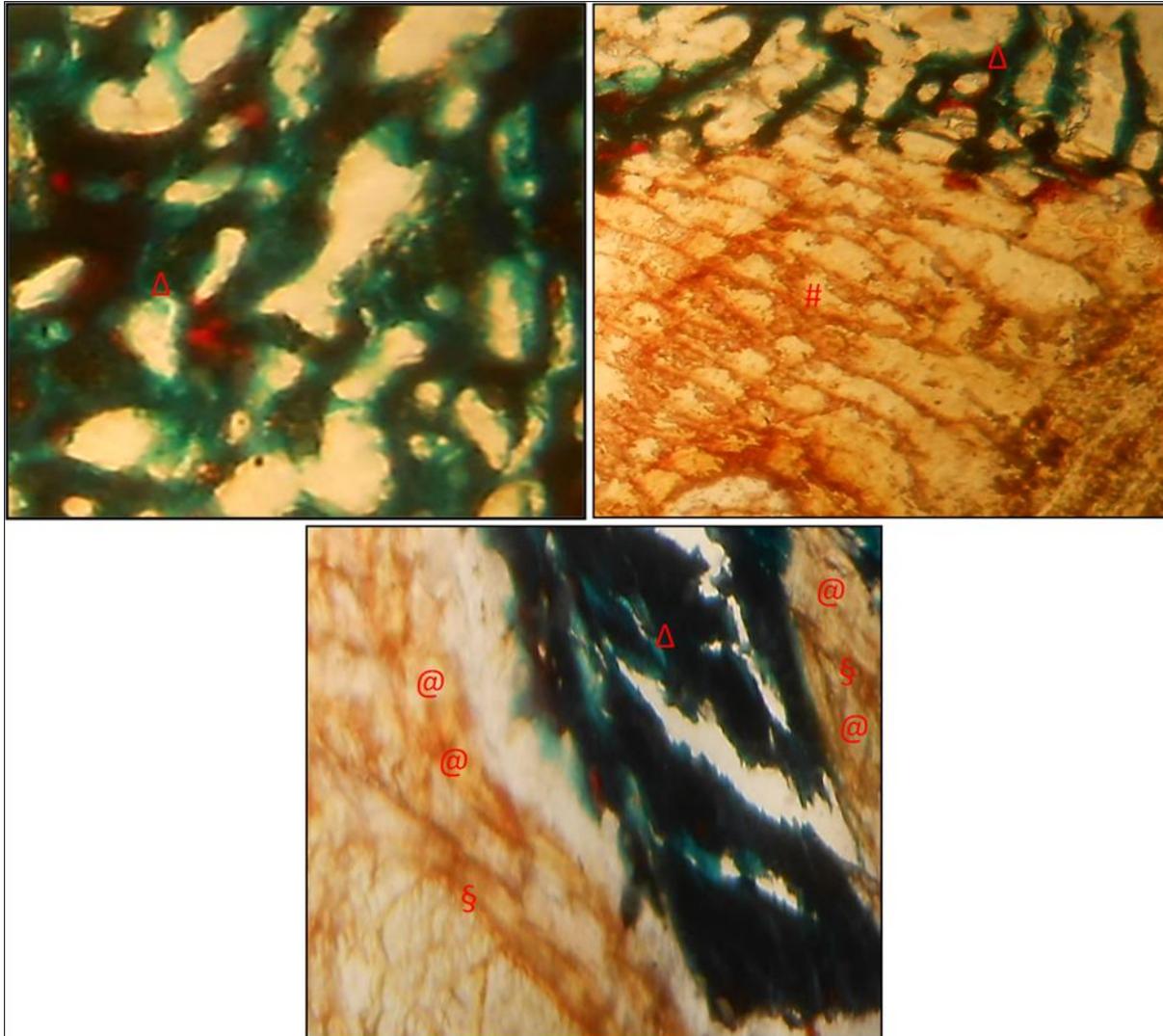


Figure 5B: coupe histologique de l'interface Os-46S6-10Zn2Ti après 1 mois d'implantation (Coloration de Goldner's trichrome) # indique le 46S6-10Zn2Ti et Δ indique le tissu osseux minéralisé, @ illustre la présence des ostéoblastes, § illustre l'existence du collagène

Partie4:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

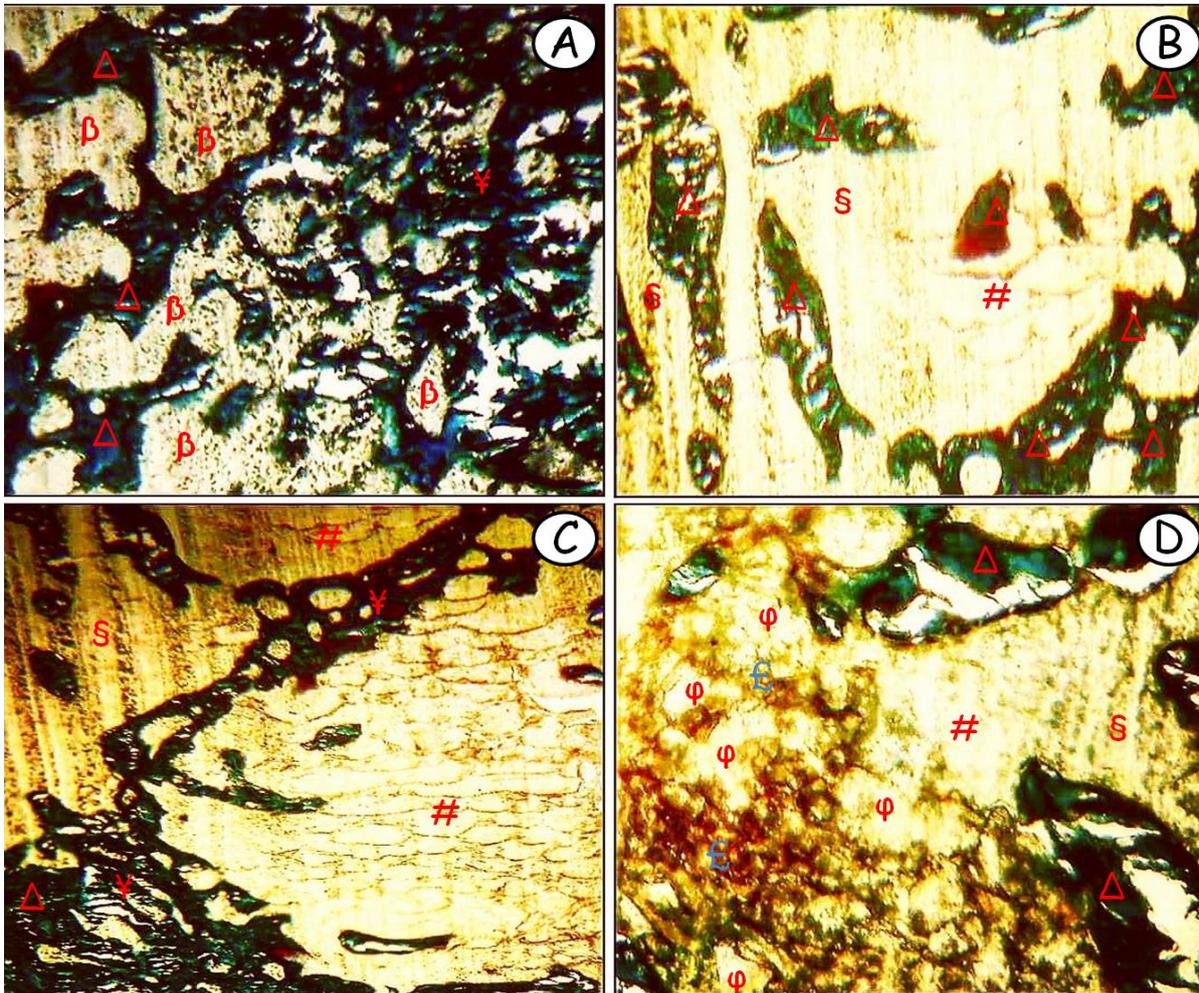


Figure 5C : coupe histologique de l'interface Os-46S6-10Zn2Ti après 4 mois d'implantation (Coloration de Goldner's trichrome) : #indique le 46S6-10Zn2Ti et Δ indique le tissu osseux mature (minéralisé) (ossification centipète), φ indique le tissu osseux, § indique la présence des bandes de collagène, β indique la présence de collagène et £ illustre la présence de substance osteoide

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite imprévisible (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

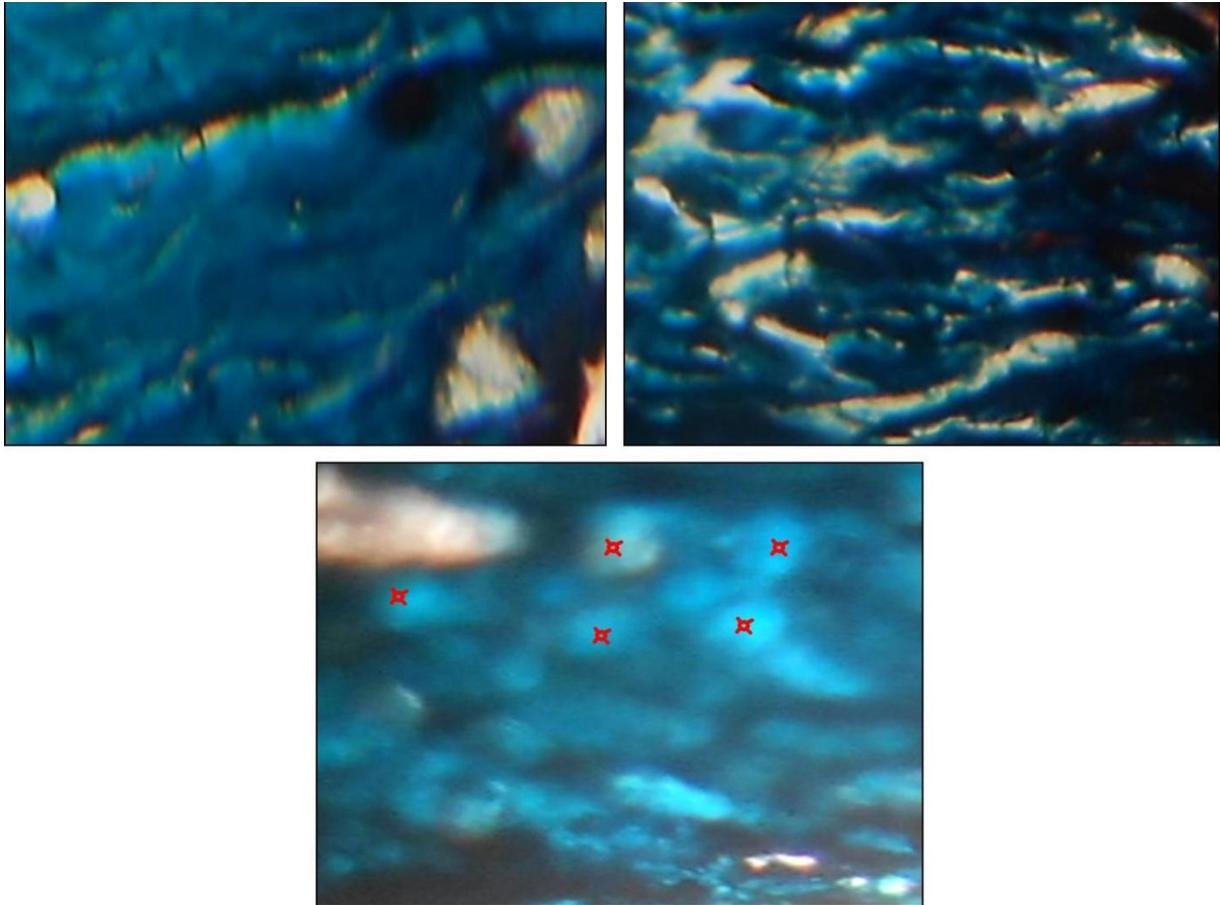


Figure 5D : coupe histologique de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti après 9 mois d'implantation (Coloration de Goldner's trichrome) x indique la présence des chondrocytes.

II-2- Exploration physicochimique

II-2-1-Etude morphologique par la microscopie électronique à balayage (MEB)

L'évaluation par microscopie électronique à balayage révèle des changements morphologiques au niveau de la cal osseuse ce qui constitue dans notre étude une étape préliminaire de l'observation de nos échantillons. Cet examen au MEB a été réalisé au niveau du régénérat osseux obtenu dans le gap créée après implantation. Après un mois d'implantation (Figure 6A) nous remarquons seulement la bioconsolidation entre l'os et le bioimplant alors que les phénomènes d'ostéointégration et de résorption du bioimplant n'ont pas été observés. Après 4 mois (Figure 6B), la bioconsolidation, la dégradation du bioimplant

Partie4:Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

et son remplacement par un dépôt apatitique ont été détectées. Après 9 mois (Figure 6C) le 46S6-10Zn-2Ti est presque totalement dégradé est remplacé par un dépôt d'apatite (Figure 6).

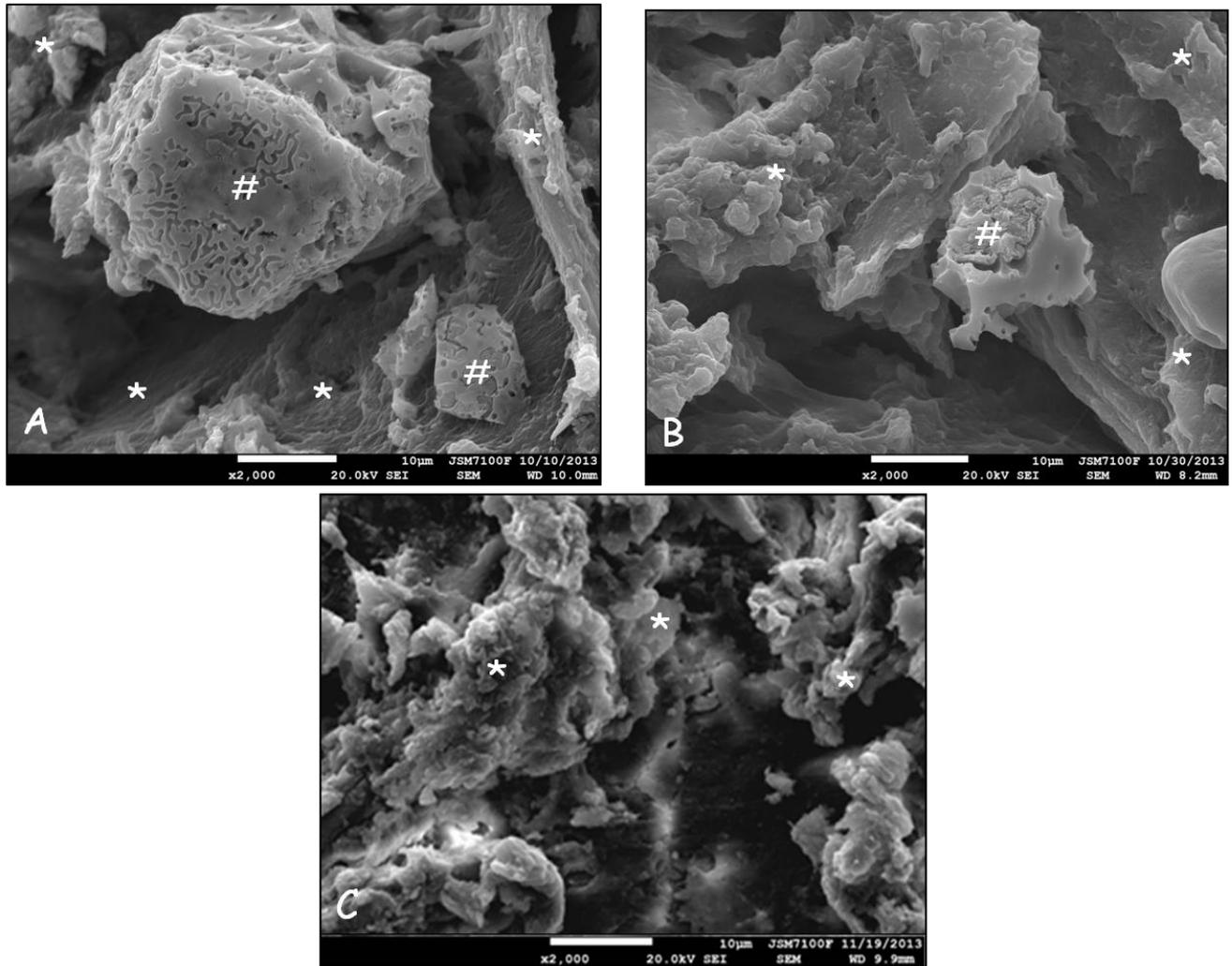


Figure 6 : Interface Os-46S6-10Zn-2Ti, analyse par MEB après 1 (A) 4 (B) et 9 mois (C) d'implantation, * indique le 46S6-10Zn-2Ti, # indique le dépôt apatitique

II-2-2- Analyse quantitative par EDS

Avant l'implantation chez le lapin, le 46S6-10Zn-2Ti montre un rapport phosphocalcique $Ca/P = 2,67$. Après implantation ce rapport Ca/P a diminué, ceci est expliqué par les échanges des éléments entre le biomatériau et le tissu environnant. En effet après 1 mois d'implantation, le rapport Ca/P est de l'ordre de 1,33 ceci est expliqué par le début

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

d'échange d'élément entre l'os et le bioimplant ainsi que l'absence de formation de dépôt apatitique. Après 4 mois d'implantation nous notons la présence d'un rapport phosphocalcique Ca/P de l'ordre de 1,66 témoignant ainsi la dégradation du bioimplant, la minéralisation du tissu osseux néoformé et la formation de l'hydroxyapatite. Finalement, après 9 mois, ce rapport Ca/P a augmenté de 1,66 vers 1,88 ce qui explique la progression de la dégradation du biomatériau et la minéralisation du tissu osseux néoformé (Figure 7A).

Après implantation nous remarquons la diminution des taux de silicium et de zinc avec le temps d'implantation expliquant ainsi la minéralisation tissu osseux, la dégradation et la résorption du 46S6-10Zn-2Ti (Figure 7B)

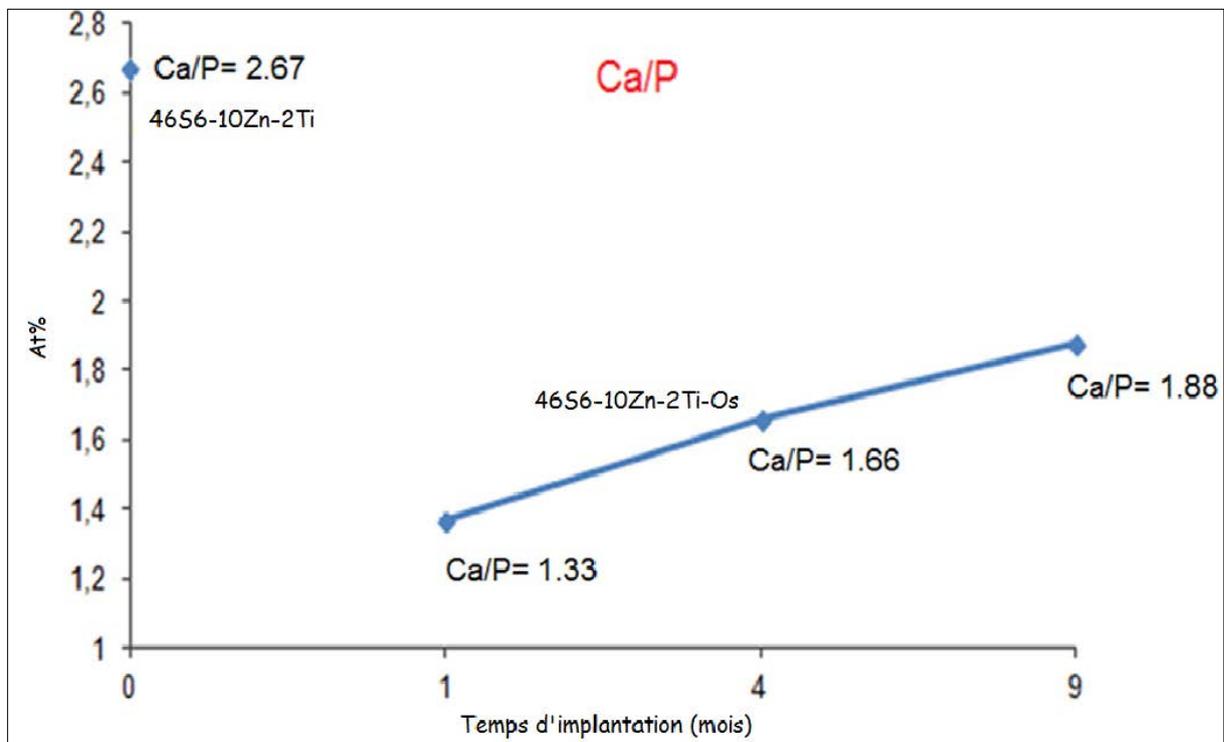


Figure 7A : Rapport Ca/P de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti, analyse par EDS après 1, 4 et 9 mois d'implantation.

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

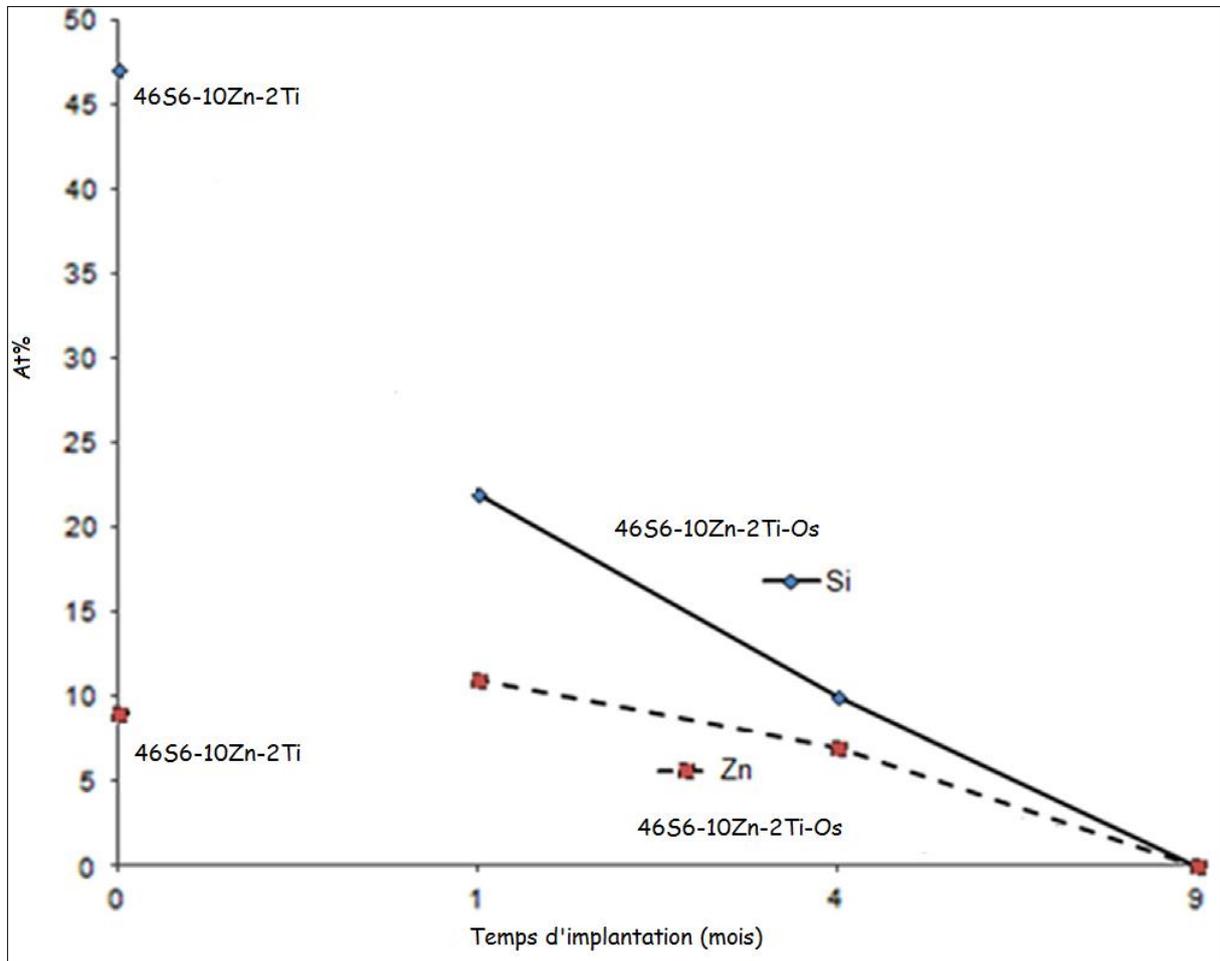


Figure 7B : Analyse quantitative des taux de silicium (Si) et de Zinc (Zn) de l'Os-46S6-10Zn2Ti, par EDS après 1, 4 et 9 mois d'implantation.

II-2-3- Analyse structurale par la diffraction des rayons X (DRX)

Les diffractogrammes DRX des poudres recueillis de 46S6-10Zn-2Ti avant et après implantation (Figure 8) montrent des changements structuraux. En effet, la vitrocéramique poreuse dopée au zinc et au titane (46S6-10Zn-2Ti) illustre la présence de deux phases cristallines référencées dans le JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standard): une phase majoritaire ($\text{Na}_4\text{Ca}_4\text{Si}_6\text{O}_{18}$) et une phase secondaire ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$). Après 1 mois d'implantation nous remarquons la présence des raies caractérisant les deux phases de la vitrocéramique, ceci est expliqué par le début de la dégradation du bioimplant. Après quatre mois nous observons la disparation des raies qui caractérisent la vitrocéramique et

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

l'apparition de 3 raies caractérisant la formation de l'apatite biologique correspondant aux plans de réflexions d'indice (002), (211) et (310). Après 9 mois nous notons la présence de la totalité des raies caractérisant ainsi l'apatite biologique.

La dégradation, la résorption du 46S6-10Zn-2Ti et la minéralisation du tissu osseux progressent avec le temps d'implantation.

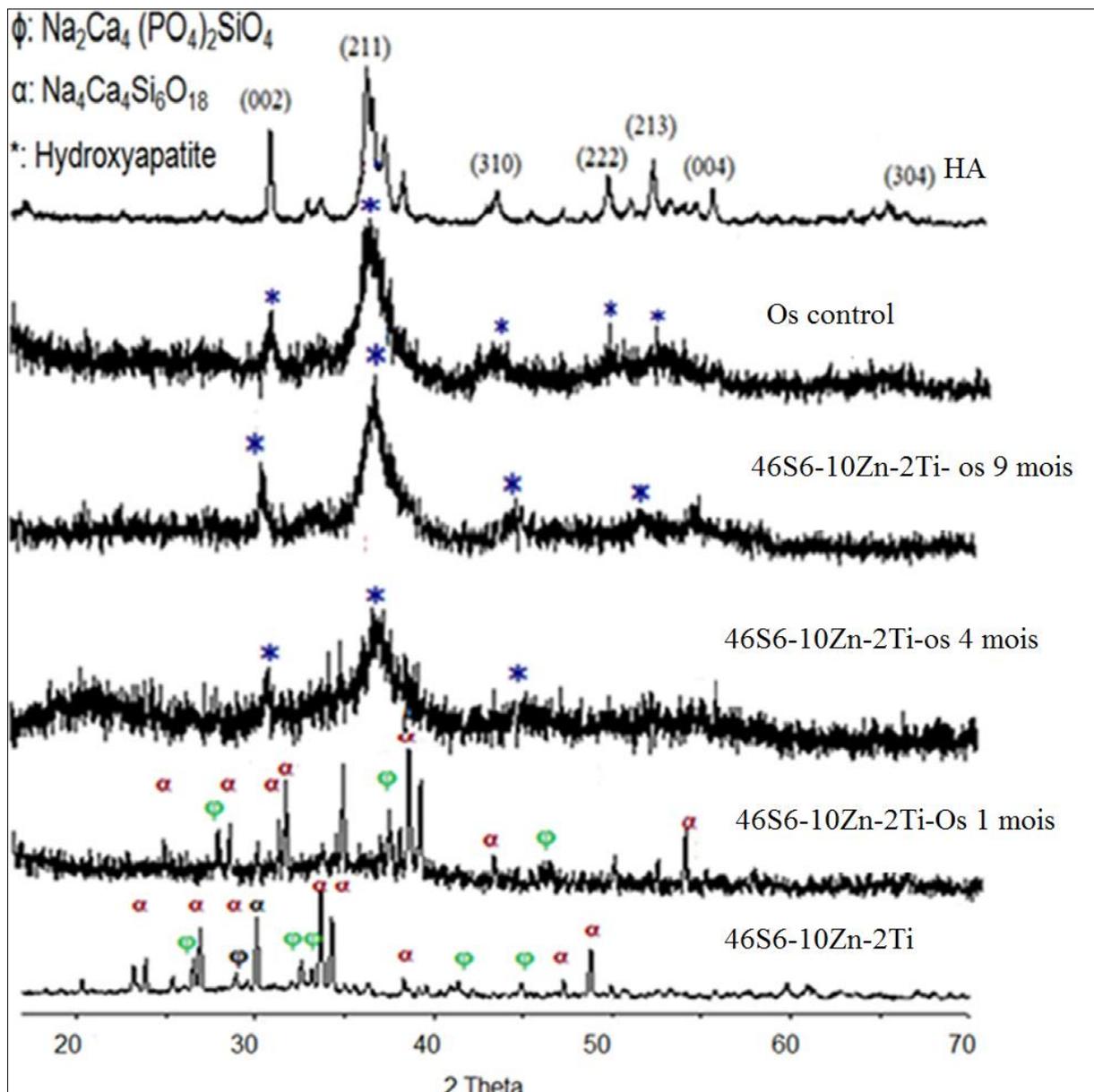


Figure 8: Analyse structurale de l'Os-46S6-10Zn-2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation par la diffraction des rayons X (DRX)

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

II-2-4- Evaluation par spectrométrie d'infrarouge (FT-IR)

Les spectres IR recueillis des poudres de 46S6-10Zn-2Ti avant et après implantation (Figure 9) montrent des changements. En effet, le spectre correspondant au 46S6-10Zn-2Ti avant implantation montre une bande qui est attribuée à une déformation angulaire Si-O-Si entre les trois tétraèdres SiO₄ et 3 bandes à 745, 932 et 1036 cm⁻¹ correspondant au Si-O et une bande de P-O observé à une longueur d'onde de 590 cm⁻¹.

Après un mois d'implantation, nous observons la présence de trois bandes de Si-O observées respectivement à des longueurs d'ondes vers 448, 526 et 920 cm⁻¹. Aussi, nous notons la présence et le déplacement des bandes de P-O à des longueurs d'ondes respectivement de 448, 526 et 920 cm⁻¹ par rapport au groupe de control. En outre nous remarquons la présence des bandes caractéristiques des amides I et II à des longueurs d'ondes de 1657 et 1540 cm⁻¹. Ce résultat explique la formation de l'apatite témoignée par l'apparition des bandes de carbonates et des amides dans les spectres 46S6-10Zn-2Ti-os. Après quatre mois, nous notons l'augmentation de la dégradation du 46S6-10Zn-2Ti. En effet, nous révélons la présence des bandes de Si-O avec des faibles intensités. Nous remarquons aussi l'augmentation des intensités des bandes des amides I et II observées respectivement vers 1242, 872 cm⁻¹ et les bandes de carbonates observées vers 1409 et de 1455 cm⁻¹. Ce résultat est expliqué par la dégradation de la matrice vitreuse. Ces bandes de Si-O ont été masquées et remplacées par des bandes de P-O à des longueurs d'ondes de 601, 564 et 1028 cm⁻¹. Ce qui indique la dégradation progressive du bioimplant et son remplacement par un dépôt d'apatite avec le temps d'implantation. Après neuf mois la dégradation du bioimplant et son remplacement par l'apatite est presque totale.

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

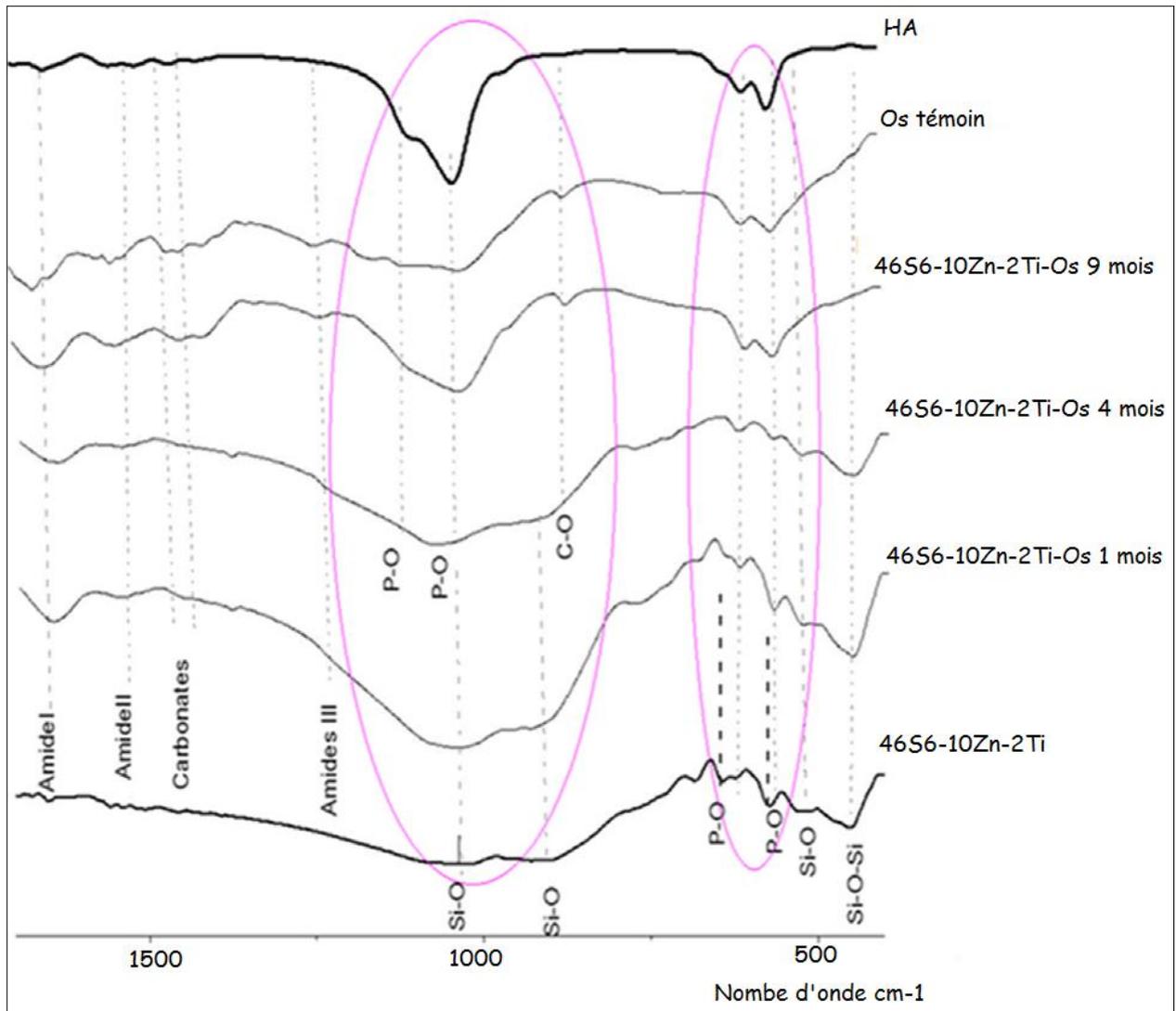


Figure 9: Analyse de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation par la spectrométrie d'infrarouge (FTIR)

II-2-5- Analyse par résonance magnétique nucléaire de ^{29}Si et de ^{31}P

Le spectre MAS- RMN de ^{29}Si de la matrice osseuse avant implantation (Figure 10) montre une faible signature illustrant l'absence de ce noyau dans l'os. Le spectre MAS-RMN de ^{29}Si de la vitrocéramique poreuse avant implantation montre la présence de deux espèces Q^2 (avec 2 atomes d'oxygène pontant) et Q^3 (avec 3 atomes d'oxygènes pontant) observées respectivement à des positions chimique de -78 ppm et -89 ppm et respectivement avec des

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite imprévisible (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

proportions de l'ordre de 21% et 79% (Wers et al, 2014). Q^2 et Q^3 sont déterminées à l'aide d'un logiciel DMFIT. Dans des travaux antérieurs la déconvolution du spectre de ^{29}Si de 46S6 illustre la présence des deux espèces Q^2 et Q^3 respectivement avec des proportions 80% et 20% et à des positions de -78 ppm et -87 ppm. Nous observons ainsi l'inversion des proportions de ces espèces Q^2 et Q^3 et ceci est lié à la matrice vitreuse de la vitrocéramique qui est plus condensée que le verre bioactif pure. Ce résultat peut être expliqué par la cristallisation produite suite au traitement thermique lors du processus de synthèse. D'après la bibliographie, les cations Ca^{2+} sont associés aux espèces Q^2 alors que les cations Na^{2+} sont associés aux espèces Q^3 [Donnell *et al*, 2008]. Les spectres MAS-RMN des implants 46S6-10Zn-2Ti-os montrent des changements qui sont liés aux réactions physico-chimiques entre le biomatériau et le tissu biologique. Ces réactions sont les suivantes : changement rapide des protons H_3O^+ de la solution physiologique avec les ions Ca^{2+} , Na^+ à partir du 46S6 et la formation de Si-OH, (b) rupture des liaisons Si-O-Si du réseau vitreux par hydrolyse. Il s'ensuit une formation des groupements silanols Si-OH à l'interface et un relargage de groupements $\text{Si}(\text{OH})_4$ dans le milieu, (c) condensation et repolymérisation d'une couche riche en silice SiO_2 sur la surface du verre, (d) migration des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} issus du matériau à travers la couche de gel vitreux riche en SiO_2 jusqu'à la surface du verre. À ceux-ci s'ajoutent les ions calcium et phosphates déjà présents dans le milieu biologique, le tout alimentent le développement d'une couche de phosphate de calcium en surface du matériau (e) cette couche amorphe de phosphate de calcium cristallise en incorporant des anions hydroxyles OH^- et carbonates CO_3^{2-} issus du milieu et se transforme en une couche mixte d'hydroxyapatite carbonatée analogue à celle présente dans l'os. Après 1 mois d'implantations, nous détectons la diminution des espèces Q^2 et Q^3 indiquant ainsi la dégradation progressive du 46S6-10Zn-2Ti. La diminution de ces espèces est accompagnée par l'apparition et le développement d'une autre espèce Q^4 . Cette espèce caractérise la condensation et la formation d'une couche riche en silicium à la surface du biomatériau. Après 6 mois le noyau de Si est totalement disparu, témoignant la disparition du biomatériau en faveur de la formation d'un tissu osseux

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

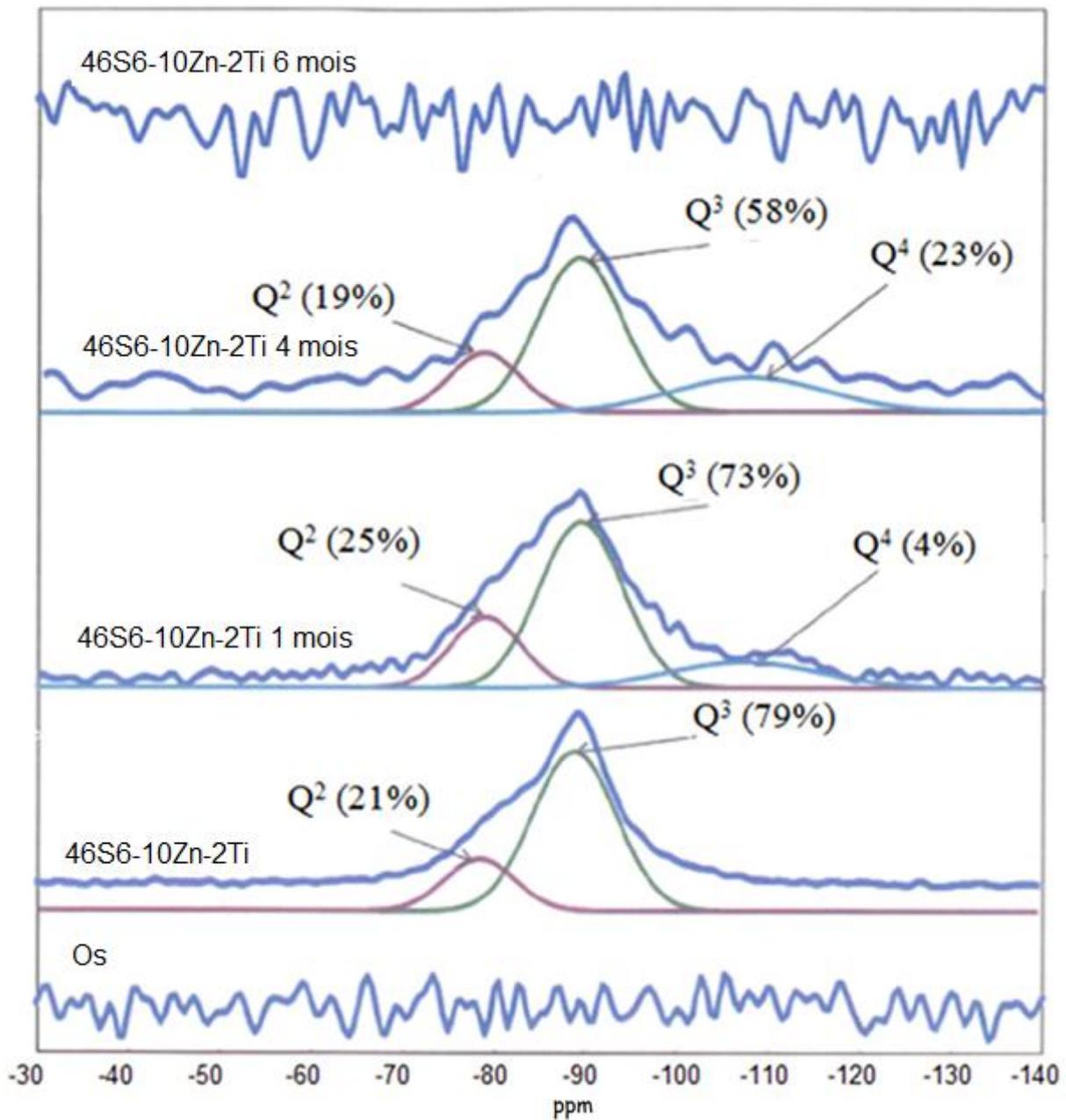


Figure 10: MAS-RMN ^{29}Si de l'interface Os-46S6-10Zn2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation

Le spectre MAS-RMN ^{31}P de la vitrocéramique poreuse avant implantation (Figure 11) montre la présence de deux espèces localisées à 3 ppm et 8 ppm. En se basant sur les valeurs de la mi-hauteur, qui correspond à 1 et 15 ppm, nous attribuons les espèces localisées à 3 ppm à la phase cristallisée noté Q^0_{c} et l'autre de 8 ppm à la phase amorphe Q^0_{a} . Les deux

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

populations sont présentes respectivement avec 52% et 48%. Nous révélons ainsi une distribution équivalente de phosphore entre les deux populations. Le spectre MAS-RMN de ^{31}P de 46S6 avant implantation montre un déplacement chimique correspondant au phosphore d'un environnement orthophosphate, correspondant ainsi qu'à l'espèce Q_p^0 . Le spectre du 46S6-10Zn2Ti après implantation montre des changements qui sont dûs aux échanges entre le bioimplant et l'environnement osseux. En effet, le spectre MAS-RMN ^{31}P de l'os natif montre la présence d'une espèce avec un déplacement chimique de 3 ppm, indiquant ainsi la présence de l'hydroxyapatite Q_{HA}^0 . Après 1 mois d'implantation, nous remarquons une faible diminution de Q_a^0 et une forte diminution de Q_c^0 et l'apparition d'une nouvelle espèce Q_{HA}^0 illustrant ainsi le début de libération de phosphore de la matrice du 46S6-10Zn2Ti et son participation dans les processus de formation de l'hydroxyapatite. Après 4 mois nous remarquons la disparition de l'espèce Q_c^0 , la diminution des espèces Q_a^0 et l'augmentation des espèces Q_{HA}^0 ceci illustre bien la dégradation progressive du bioimplant et l'évolution du développement et de formation du nouveau tissu osseux néoformé. La phase amorphe est une phase majoritaire alors que la phase cristalline est une phase minoritaire et qui participe dans la formation du tissu osseux. Après 6 mois la progression de la diminution des espèces Q_a^0 et l'augmentation de l'espèce Q_{HA}^0 sont accentuées. Les deux phases amorphe et cristalline participent à la synthèse de l'HA néoformée mais la participation la plus importante est assurée par la phase cristalline.

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

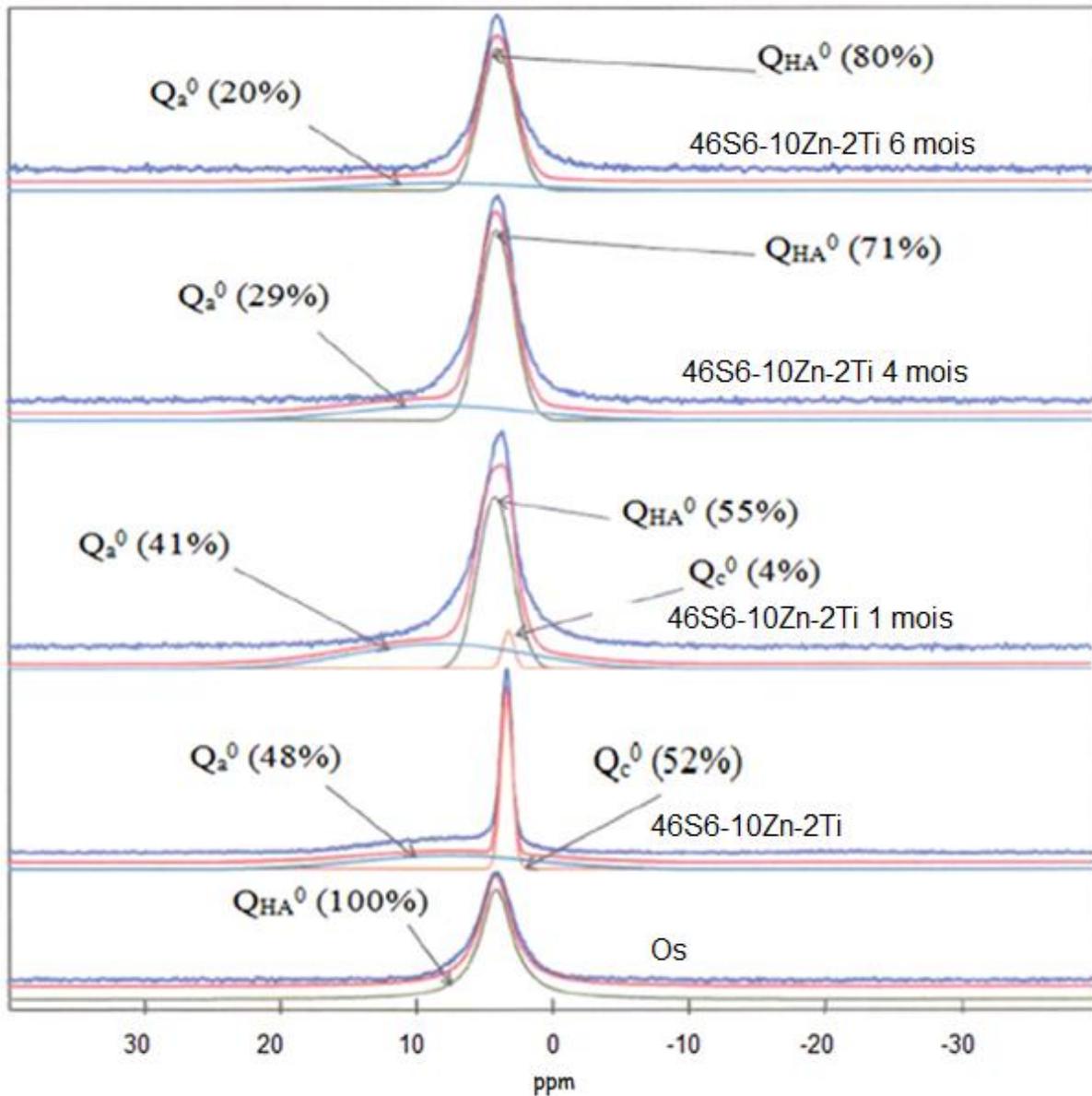


Figure 11: MAS-RMN ³¹P de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti après 1, 4 et 9 mois d'implantation

III-Discussion

La perte de substances osseuses (PSO) diaphysaire est un problème difficile à résoudre en traumatologie en raison notamment des lésions des parties molles et de la fréquence d'une infection associée.

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

Actuellement, la synthèse et le développement des biomatériaux possédant un effet important dans la régénération des tissus osseux ont eu un important développement.

L'objectif de notre étude est d'évaluer le comportement du composite 46S6-10Zn-2Ti dans la régénération d'une perte osseuse diaphysaire. Le zinc qui est présent en tant qu'un élément à l'état de trace dans le corps humain joue un rôle important dans la régénération et le développement du tissu osseux. Il stimule la prolifération et le développement des cellules osseuses [Moonga *et al*, 1995].

Après implantation nous ne notons ni signe de toxicité ni signe d'inflammation illustrant la non toxicité de notre composite d'une part et d'autre part la présence de zinc en tant qu'élément dopant. En effet, dans des travaux antérieurs, il a été démontré qu'il possède un effet cytotoxique [Oudadesse *et al*, 2011]. Le zinc possède aussi un effet cicatrisant. Nous illustrant aussi l'intégration du bioimplant avec l'os est ceci est expliqué par la biocompatibilité de ce composite qui est dûe à la présence de titane dans sa matrice vitreuse. Ainsi, la présence de titane améliore la biocompatibilité de ce composite. En effet, il apparaît que le titane se comporte comme une substance inerte n'entraînant aucune réaction inflammatoire [Hildebrand, 1989] y compris en injection intraveineuse, et l'allergie à son contact ne concernerait que 2.5 % de la population. En effet, pour toutes ces qualités, le titane est donc le matériau de choix en prothèse ostéointégrée, c'est le cas en chirurgie orthopédique où l'on fait appel aux prothèses en titane pour le remplacement d'articulations comme les hanches, les genoux ... mais également en chirurgie implantaire. L'examen radiographique est classiquement utilisé en clinique pour l'évaluation de la cal osseuse après comblement. C'est une technique maîtrisée depuis très longtemps, peu onéreuse, dont l'interprétation est rapide et nous a permis de qualifier de nombreuses caractéristiques de la cal de consolidation. Dans la présente étude, nous avons réalisé des clichés postopératoires systématiquement, puisqu'ils servent de référence pour le suivi radiologique. Ils sont également indispensables lors de la réalisation d'ostéotomie afin de contrôler la bonne réalisation du geste technique projeté ; ainsi le site d'ostéotomie est contrôlé pour mettre en évidence une éventuelle ostéotomie incomplète et de vérifier le bon positionnement du bioimplant. Chacun de nos animaux a subi un examen radiologique postopératoire qui nous a permis aussi de vérifier le bon positionnement du fixateur par rapport au trait de l'ostéomie ainsi que l'intégrité du reste

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

du tibia (absence de traits de refend près des broches, alignement du montage etc...) et le bon positionnement du greffon. En effet, cette technique nous a procuré des informations rapides et précises sur la localisation, la délimitation de la cal, la minéralisation du tissu osseux et la résorption du bioimplant. Les fractures ou les traits de refend sur le site d'ostéotomie sont recherchés systématiquement. L'intérêt princeps de l'étude radiologique réside dans l'évaluation qualitative de la minéralisation. En plus, un cliché post opératoire nous permet de disposer d'une image de départ à partir de laquelle on effectuera une comparaison pour évaluer l'avancée du processus de réparation. Une fois la cal commence à être calcifié, il est préconisé de réaliser des clichés radiographiques toutes les 1 à 2 semaines pour évaluer la progression de la cal et d'adapter le cas finissant le rythme de distraction [Donnan, 2002]. Dans notre étude, des clichés ont été réalisés tous les mois dès l'ostéotomie. L'évaluation qualitative nous apporte aussi les informations suivantes :

La progression de la minéralisation de la cal osseuse et la dégradation du bioimplant au cours temps d'implantation.

Le scanner permet de visualiser des coupes et fournit des informations supplémentaires par rapport à une radiographie simple. Il peut permettre d'assurer le diagnostic, mais son intérêt principal est de repérer des complications difficiles à discerner sur une radiographie simple, comme les fissures. Cette technique utilise aussi les rayons X, à des doses beaucoup plus importantes que la radiographie simple. Le scanner montre aussi la présence des phénomènes de corticalisation, de résorption et de dégradation de biomatériaux avec le temps d'implantation. Ceci est expliqué par la présence de zinc dans la matrice vitreuse de la vitrocéramique qui agit comme étant un cofacteur stimulant la prolifération et la différenciation des protéines qui interviennent dans la synthèse de la matrice organique de l'os comme le collagène [Doherty *et al*, 2002]. Le verre bioactif pur est connu par sa capacité de se lier fortement au tissu osseux et de stimuler la synthèse de l'os à cette interface os-biomatériaux *in vivo* après implantation [Hench *et al*, 2009]. Le micro scanner a montré l'ostéointégration des cellules osseuses dans les pores du bioimplant. Ce résultat est expliqué d'une part par la présence de zinc et d'autre part par la présence des pores dans le bioimplant. Il a été démontré que les ions qui sont libérés lors de la dissolution du biomatériau sont ceux responsables de l'attachement, la prolifération et la différenciation des cellules osseuses

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

[Valerio *et al*, 2004]. La présence des pores dans le biomatériau favorise la prolifération, la différenciation et l'ostéointégration des cellules osseuses dans les pores du biomatériau [Puleo *et al*, 1999]. Dans des travaux antérieurs, il a été démontré que l'immersion de 46S6-10Zn-2Ti dans le SBF (stimulate body fluid) stimule la formation d'une couche d'HA à sa surface [Wers *et al*, 2014].

Dans notre cas le biomatériau de substitution osseuse est de type poreux, l'intégration de substitut est étroitement liée 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...) [Andersson *et al*, 1990] or notre composite est une vitrocéramique poreuse présentant un facteur déterminant pour la repousse et la revascularisation osseuse. En même temps il a une surface active et osteopromotive aboutissant à la formation et l'apparition d'une couche d'apatite sur la couche de SiO₂ lors de son contact avec un liquide physiologique [Andersson *et al*, 1990]. L'ostéoconduction progressive est assurée ensuite par la pénétration cellulaire et la micro vascularisation au sein des pores. A moyen terme, il existe une résorption du matériau avec ostéoformation qui aboutit à un équilibre résorption-apposition [Bignon *et al*, 2003]. Ainsi, le réhabitation est centripète et surtout lente et progressive. L'ostéoconduction débute par une phase de résorption entraînant un relargage des ions et des éléments traces contenus dans le substitut. Or notre site d'implantation choisi est le tibia, qui, du fait de sa structure compacte, mettra beaucoup plus de temps à être pénétré par les vaisseaux et les cellules de l'hôte. Le résultat d'implantation indique une fragmentation /désagrégation de la céramique permettant une bio résorption. Le tissu osseux nouvellement formé est immature, sans formation ni de structure lamellaire ni des canaux haversiens [Rosa *et al*, 2002].

La diffraction des rayons X après implantation montre des changements. En effet, après un mois d'implantation nous révélons la présence des deux phases caractéristiques du bioimplant, ce qui explique bien la lente dégradation de notre composite. Après 4 mois nous notons la disparition de ces phases du biomatériau et l'apparition des 3 raies caractérisant la formation de l'hydroxyapatite. Finalement, après 9 mois nous remarquons l'apparition de toutes les raies caractéristique du bioimplant.

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

Les spectres d'absorption infrarouge de la vitrocéramique poreuse après implantation montrent des évolutions au cours du temps d'implantation. En effet, après un mois d'implantation nous illustrons l'apparition des amides I à une longueur d'onde de 167 cm^{-1} indiquant ainsi la minéralisation du tissu osseux [Singh *et al*, 2010]. La dégradation du composite (46S6-10Zn-2Ti) est augmentée avec le temps d'implantation en faveur de la formation et la cristallisation d'un nouveau tissu osseux. Ainsi, nous notons l'apparition des bandes caractéristiques des vibrations des bandes de carbonates de C=O des amides I [Singh *et al* 2010]. Quatre mois après implantation, le 46S6-10Zn-2Ti est totalement dégradé et remplacé par le tissu osseux souligné par l'apparition de toutes les bandes caractéristiques de l'os. Les bandes des amides II localisés à une longueur d'onde de 1542 cm^{-1} résultant de la combinaison des bande de C-N et des bandes N-H favorisant la différenciation et la prolifération de la matrice osseuse après implantation [Hench *et al*, 2000, Singh *et al*, 2010] La cristallisation de l'HA formée à la surface du bioimplant 46S6-10Zn2Ti est observée par l'apparition des amides II [Singh *et al*, 2010] et des bandes de carbonates [Singh *et al*, 2010]. Ces résultats caractérisent la déposition de l'apatite à la surface du bioimplant [Reffitt *et al*, 2003]. Neuf mois après implantation, l'intensité de ces bandes augmente et prend une structure similaire à l'apatite biologique. La biocompatibilité de 46S6-10Zn-2Ti après implantation dépend de sa composition chimique [Reffitt *et al*, 2003]. En effet, le titane s'intègre à l'os de façon permanente suivant une déformation plastique de l'interface os-implant [Brånemark *et al*, 1969]. L'augmentation du rapport phosphocalcique Ca/P augmente avec le temps d'implantation. Ces résultats expliquent ainsi le rôle primordial du zinc dans la minéralisation de l'interface Os-46S6-10Zn-2Ti. L'incorporation de Zn dans la matrice vitreuse conduit à l'augmentation de l'attachement à la différenciation des ostéoblastes [Toworfe *et al*, 2009]. Après 1 mois d'implantation la diminution progressive de Si est un processus de dégradation du bioimplant et son remplacement par l'os. Après quatre et neuf mois les valeurs de Si diminuent et chutent et atteignent zéro après neuf mois. Ce résultat illustre bien la dégradation de la vitrocéramique poreuse en faveur du tissu osseux. Le résultat rapporté par le MAS-RMN confirme les résultats précédents. En effet le spectre MAS-RMN de ^{29}Si des implants 46S6-10Zn-2Ti montre la diminution progressive des espèces Q^2 et Q^3 avec le temps d'implantation en faveur de l'augmentation des espèces Q^4 , ce qui indique la

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite improtante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

dégradation du biomatériau et la formation d'une couche geleuse à la surface du biomatériau. Cette surface joue un rôle important dans la bioactivité du bioimplant [Hench *et al*, 1998]. Après 6 mois, ces espèces ont été disparues et remplacées par le tissu osseux. Le verre bioactif conduit à l'ostéoconduction et l'ostéoproduction [Bignon *et al*, 2003]. Le spectre MAS-RMN ^{31}P du 46S6-10Zn-2Ti après implantation montre la diminution des espèces Q_a^0 et Q_c^0 en faveur de la formation de l'espèce Q_{HA}^0 . Ces espèces montrent la dissolution du biomatériau et la participation du phosphore relagué dans la formation de la nouvelle apatite.

IV-Conclusion

Le comportement du 46S6-10Zn-2Ti après son implantation a été évalué par une étude biologique par le biais d'une étude macroscopique au moyen des rayons X et du scanner (CT) illustre la présence des phénomènes de corticalisation et de résorption du bioimplant avec la progression du temps d'implantation. Aussi au moyen d'une étude microscopique, à l'aide du microscanner (mCT) et d'une investigation histologique, montre à partir du 4^{ème} mois la présence des phénomènes d'ostéointégration et de résorption du bioimplant. Il révèle aussi vers le 9^{ème} mois une dégradation quasi- totale du bioimplant et son remplacement par des cellules osseuses. Pour approfondir notre investigation, des analyses physico-chimiques ont été réalisées afin de comprendre les phénomènes évolutifs aux cours du temps. Parmi celles-ci, la microscopie électronique à balayage (MEB) qu'à partir du 4ème mois, met en évidence une morphologie similaire à celle du tissu osseux à l'interface os- 46S6-10Zn2Ti, vers le 9^{ème} mois le bioimplant est presque totalement dégradé et remplacé par un dépôt apatitique. La spectrométrie d'absorption infrarouge (FTIR) montre aussi à partir du 4^{ème} mois, une formation osseuse très remarquable. La diffraction des rayons X (DRX) montre la cristallisation de l'interface os-46S6-10Zn2Ti à partir du 4ème mois dans un système hexagonal ressemblant à celui de l'os. Enfin la résonance magnétique nucléaire (MAS-RMN) montre à partir du 6^{ème} mois que le spectre MAS-RMN ^{29}Si illustre la disparition des Q^2 , Q^3 et Q^4 indiquant la dégradation progressive du bioimplant. Le spectre MAS-RMN ^{31}P illustre l'augmentation de l'intensité de l'espèce Q_{HA}^0 avec la progression du temps

Partie4: Utilisation d'un biomatériau « 46S6-10Zn-2Ti » avec une porosité induite importante (expansé). Application pour la bioconsolidation chez un modèle animal à perte osseuse induite (le lapin)

d'implantation démontrant la formation de l'apatite en faveur de la dégradation du biomatériau.

Discussion générale

Le domaine des biomatériaux est un domaine pluridisciplinaire regroupe les biologistes, les physico-chimistes... Ce travail de thèse est basé sur l'amélioration des propriétés biologiques et physico-chimiques des verres bioactifs 46S6 associés à des molécules.

Au cours de ce travail de thèse, notre objectif consiste à développer les performances des verres bioactifs utilisés comme implants osseux par l'ajout d'un bisphosphonate ayant un effet anti-ostéoporotique : le risédronate [Russel *et al*, 2008]. Ainsi que des éléments chimiques tels que le zinc, le titane et l'azote dans la matrice vitreuse pour induire une porosité importante (63%). En effet, le zinc possède un effet antioxydant certains [Barouki, 2006], il intervient dans les processus de cicatrisation et de prolifération ostéoblastique [Ito *et al*, 2002]. Le titane augmente la biocompatibilité des biomatériaux [Williams 2008]. La porosité constitue un paramètre primordial pour les biomatériaux utilisés en sites osseux. La porosité induite doit être proche celle de la matrice osseuse. La taille minimale des pores permettant une ostéoformation au sein du biomatériau varie entre 100 et 600 μm , [Karageorgiou *et al*, 2005]. En effet, elle favorise les processus de résorption et de dégradation du bioimplant et stimule les processus de néo vascularisation et d'ostéointégration des cellules osseuses dans les pores du bioimplant.

En effet le premier biomatériau a été évalué *in vitro* en l'absence des cellules. L'objectif étant d'évaluer sa réactivité chimique. La réactivité chimique a été établie suite à des immersions des bioverres pur et associés au risédronate dans le SBF. Des analyses physico-chimiques tel que la DRX, le FTIR, le RAMAN, le MEB couplé à l'EDS et l'ICP-OES ont montré que la bioactivité décroît avec l'augmentation de la quantité du risédronate ajoutée au verre pur. Ceci est en accord avec le résultat rapporté par Dietrich *et al* [Dietrich *et al*, 2008]. Elle a montré qu'après les immersions des verres purs et dopés avec le magnésium, la réactivité chimique décroît lorsque la teneur en Mg croît

Le comportement de la vitrocéramique 46S6-10Zn-2Ti a été évalué sur deux modèles d'animaux différents : un modèle ostéoporotique (rattes irradiées aux rayons gamma) et un modèle à perte osseuse induite :(lapins). L'évaluation de l'effet anti-ostéoporotique du 46S6-10Zn-2Ti a été étudiée par des explorations biologiques et physico-chimiques sur les matériaux-46S6-10Zn-2Ti-os.

Les investigations biologiques montrent l'effet antioxydant du zinc suite à l'étude de la balance oxydative. Ainsi, cette étude a été réalisée par l'exploration de la peroxydation lipidique. Ce dernier a été diminué suite à l'implantation du 46S6-10Zn-2Ti. Aussi l'implantation des rattes avec ce bioimplant induit l'augmentation du SOD, GPx et CAT.

Toute fois, le zinc participe à la synthèse des métallothioneine. Ces dernières peuvent servir comme des piègeurs des radicaux libres [Mulder *et al*, 1994 ; Sturniolo, 2001].

Le zinc représente aussi un oligoélément antioxydant [Roussel *et al*, 2009], il est connu comme un co-facteur pour le SOD [Prasad, 2009]

L'étude biologique a été aussi approfondie par une étude histologique. Cette étude a montré l'absence des phénomènes de fibrose et d'inflammation, ceci illustre le rôle de titane dans l'amélioration de la biocompatibilité [Andrew *et al*, 2010] de ce composite 46S6-10Zn-2Ti.

A travers les résultats observés après l'implantation des rattes irradiées avec le 46S6-10Zn-2Ti, nous concluons que l'ostéointégration des cellules osseuses dans les pores du bioimplant conduit à sa dégradation et son remplacement par les cellules osseuses.

Ce résultat met en évidence la performance de zinc dans les processus de prolifération ostéoblastiques [Ito *et al*, 2002].

L'étude biologique a été approfondie par une étude physico-chimique. Ainsi les résultats obtenus par MEB-EDS, FTIR, DRX, MAS-RMN et ICP-OES ont montré le ralentissement des processus de la formation apatitique avec l'augmentation des doses d'irradiations. La comparaison des résultats rapportés suite à l'implantation des rattes irradiées avec le 46S6 et des rattes irradiées avec le 46S6-10Zn-2Ti met en relief le rôle du zinc dans la maturation osseuse [Jebahi *et al*, 2013].

L'évaluation du composite 46S6-10Zn-2Ti dans le processus de bioconsolidation a été réalisée dans des tibias de lapins ayant des pertes osseuses induites. Les analyses biologiques qui ont été réalisées par le biais de l'imagerie médicale (radio, scanner et microscnner) et l'histologie montrent le rôle primordial de ce composite dans la reconstruction osseuse.

En effet, l'imagerie médicale qui signale la présence des phénomènes de corticalisation, résorption et d'ostéointégration du biomatériau et la formation d'une cal périostée met aussi en relief le rôle jouer par la présence des pores dans notre composite [Mosbahi *et al*, 2016, Mosbahi *et al*, 2014]. Cette exploration a été approfondie par une étude histologique qui montre la progression de la dégradation du 46S6-10Zn-2Ti en faveur de la néoformation d'un nouveau tissu osseux. Ce résultat est en accord avec celui affirmé par jebahi et al [Jebahi *et al*, 2013].

L'investigation physico-chimique met aussi en relief, le rôle ostéogénique de ce composite (46S6-10Zn-2Ti). En effet, les résultats obtenus par MEB-EDS, DRX, FTIR et MAS-RMN montrent la progression de la formation de l'apatite avec le temps d'implantation [Mosbahi *et al*, 2016].

Conclusions générales

Certains biomatériaux présentent depuis peu un axe de recherche prometteur dans le traitement de certaines ostéopathologies et infections osseuses

Ce travail de thèse s'articule autour de deux points essentiels :

i) Synthèse et caractérisation d'un matériau hybride (46S6-xRIS)

- Dans cette partie nous proposons une synthèse et caractérisation physicochimique des verres bioactifs associées au risédronate (46S6-xRIS). La caractérisation physicochimique par FTIR et RAMAN montre l'augmentation des bandes de RIS chez les composites 46S6-20RIS. Le spectre MAS-RMN²⁹Si montre la perturbation de la matrice vitreuse du 46S6 par l'apparition d'une nouvelle espèce Q⁴ ainsi que celui de MAS-RMN ³¹P illustre l'apparition des espèces Q^{RIS1} et Q^{RIS2} dans les spectres de 46S6-20RIS. La microscopie électronique à balayage révèle que les blocs du verre ont été enrobés par les particules de risédronate. L'analyse chimique montre que l'association entre le verre et le RIS a été établie au moyen d'un échange ionique entre le silicium et le risédronate. En effet, le risédronate occupe le maximum des sites du silicium. Aussi, l'analyse chimique par ultraviolet-visible et ICP-OES signalent que l'association se stabilise après 40 min d'incubation.
- Test *in vitro* sans cellules (Immersion dans le SBF) et avec cellules des biomatériaux synthétisés: Les immersions dans le SBF ont montré que la bioactivité des composites 46S6-xRIS décroît avec l'augmentation de la quantité du risédronate associée au verre bioactif. En effet les résultats rapportés par le FTIR et le RAMAN montrent l'apparition des bandes d'HA après 30 jours d'immersion sur les spectres 46S6-8RIS. Ainsi, l'étude cristallographique par le DRX montre aussi l'apparition des raies caractéristiques de l'HA à la surface de 46S6-8RIS. L'étude morphologique au moyen du MEB révèle l'apparition des fragments d'HA à la surface du 46S6-8RIS. La dégradation du biomatériau et la formation de l'HA ont été étudiées par la cinétique du relargage du calcium, du phosphore et du silicium. En effet, la cinétique du silicium augmente avec le temps d'immersion signalant ainsi la dissolution et la dégradation de la matrice vitreuse du composite 46S6-8RIS. Cependant, la cinétique de libération de calcium et de phosphore diminue avec le temps d'immersion illustrant ainsi leur consommation pour la formation de l'HA.

ii) L'implantation d'un nouveau biomatériau basé sur un verre associé à un oxyde de Zinc (ZnO) et un nitrure de titanium (TiN) pour induire une porosité conséquente

et son évaluation chez un modèle ostéoporotique (les rattes irradiées aux rayons gamma) et un autre modèle ayant une perte osseuse induite (les lapins)

- Nous avons proposé l'usage d'un biomatériau poreux « 46S6-10Zn-2Ti » pour la restauration du tissu osseux trabéculaire chez des rattes à ostéoporose induite par irradiation aux rayons gamma. En effet, sur les échantillons 46S6-10Zn-2Ti –os des analyses biologiques et physico-chimiques ont été établies afin de comprendre la dégradation et la dissolution du 46S6-10Zn-2Ti en faveur de la néoformation d'un tissu osseux. Nous avons exploré la balance oxydative par la détermination du niveau de peroxydation lipidique. Ceci est évalué par les substances TBARS osseuses et la détermination des enzymes antioxydants (SOD, CAT et GPx). Nous remarquons que la restauration de cette balance chez les groupes implantés avec le 46S6-10Zn-2Ti illustre le rôle antioxydant du zinc. De même l'étude histologique a montré le rétablissement de la trame osseuse par la formation et la calcination du tissu osseux. L'étude biologique a été renforcée par analyse physico-chimique. En effet, l'étude morphologique par le MEB montre chez les groupes irradiés à 1Gy montre la dégradation du 46S6-10Zn-2Ti et son remplacement par un dépôt d'apatite. La formation apatitique est aussi argumentée par le rapport phosphocalcique Ca/P= 1,68. L'évaluation structurale par les spectres MAS-RMN ²⁹Si, ³¹P et ¹³C montre aussi la dégradation et le rétablissement de la trame osseuse avec la diminution de la dose d'irradiation.
- Utilisation d'un biomatériau à porosité expansé « 46S6-10Zn-2Ti » pour la biconsolidation osseuse sur un modèle animal: lapins à pertes osseuses. Cette étude a été menée par une exploration biologique et physico-chimique. Le mCT a montré l'ostéointégration des cellules osseuses dans les pores du 46S6-10Zn-2Ti et le début de dégradation et de résorption du matériau. L'étude histologique révèle la progression de la résorption du 46S6-10Zn-2Ti et son remplacement par un tissu minéralisé après 9 mois d'implantation. Cette étude a été réalisée par une étude morphologique, structurale et cristallographique. Le MEB a montré la résorption du 46S6-10Zn-2Ti et son remplacement par un dépôt apatitique, le spectre MAS-RMN ²⁹Si montre la résorption du 46S6-10Zn-2Ti soulignée par la présence d'un spectre similaire à celle de l'os après 6 mois d'implantation. Le spectre MAS-RMN ³¹P illustre le développement et l'augmentation de l'espèce caractérisant l'HA après 6 mois d'implantation. L'étude spectroscopique et cristallographique par FTIR et DRX ont montré la présence d'un spectre IR et d'un diffractogramme DRX similaires à ceux de

l'HA biologique. Ces résultats mettent en relief le bon effet de la présence des pores et de l'incorporation du Zn et du Ti dans notre composite le 46S6-10Zn-2Ti.

En conclusion, ce travail met en évidence l'amélioration de la qualité et de l'efficacité d'un biomatériau à base de verre bioactif dopé par le Zinc, le titane et le risédronate. Cette amélioration est confirmée au cours de la synthèse par des tests « in vitro » sans cellules et ainsi que sur un modèle animal ostéoporotique (rattes irradiées) et sur un autre ayant une perte osseuse induite (lapins).

Perspectives

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse ouvrent l'horizon aux nombreuses possibilités d'investigations sur les verres bioactifs et leurs applications potentielles. Des perspectives portent sur la possibilité de fonctionnaliser la surface des verres bioactifs par greffage de substances, leurs associations à des cellules souches ou à des facteurs de croissance pour maximiser leurs performances et stimuler l'ostéogenèse.

Notre travail signale aussi la possibilité de l'investigation des composites 46S6-xRIS *in vivo*. Cette expérimentation a été déjà démarrée par notre équipe de recherche par l'implantation de ce composite dans des condyles fémoraux des ratte ostéoporotiques. Les évaluations physico-chimiques sur les échantillons Os-46S6-8RIS a été faite à Rennes durant ce dernier stage. L'exploration biologique par le biais de l'évaluation de la balance oxydative et l'étude histologique et qui sont en cours

Ce travail illustre aussi la synthèse et la caractérisation d'un autre composite verre pur avec différentes pourcentages de raloxifène et l'investigation de la réactivité chimique de ce composite suite à des expérimentations *in vitro*, cette partie a été menée lors de ce dernier stage. De meme la possibilité de l'exploration de ce composite après son implantation dans des tibia des lapins.

References

- 1- **Aiji Yajima MD, Yoshihide Ogawa MD, Hideaki E Takahashi MD, Yoshihiro Tominaga MD, Tsunamasa Inou MD, Osamu Otsubo MD**, Changes of bone remodeling immediately after parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism, *American Journal of Kidney Diseases*, 2003, 42, 729–738.
- 2- **Ananda KJ, K Mohan, K Ansar and R Sharada**, Snake bite in dogs and its successful treatment, *Vet World*, 2009, 2, 66-67.
- 3- **Andersson K, Luostarinen T, Strand AS, Langseth H, Gislefoss RE, Forslund O, Pawlita M, Waterboer T, Dillner J**, Prospective study of genital human papillomaviruses and nonmelanoma skin cancer, *Int J Cancer*, 2013, 133, 1840-5
- 4- **Andersson MI, Perry W, Mortimer CH**, Bone density screening for osteoporosis, *Lancet*, 1990 Nov, 3, 33, 1133-4.
- 5- **Ashby J, Hubbert V, Cotrel-Gibbons L, Cox K, Digan J, Lewis K, Langmack G, Matiti M, McCormick D, Roberts L, Taylor D, Thom N, Wiggs M, Wilson L**, The enquiry-based learning experience: An evaluation project, *Nurse Educ Pract*, 2006 6, 22-30.
- 6- **Bacci G, Picci, Ferrari P, Mercuri S, Briccoli M, Donati A, Manfrini D, Zanoni M, Forni A, Campanacci C**, Synchronous multifocal osteosarcoma: results in twelve patients treated with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of all involved bones, *Ann Oncol*, 1996,7, 864-6.
- 7- **Barouki R**, Ageing free radicals and cellular stress, *Med Sci*, 2006 ,22 , 266-72.
- 8- **Barroug A, Glimcher MJ**, Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: adsorption and release of cisplatin in vitro, *J Orthop Res*, 2002, 20, 274-80
- 9- **Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN and Green AR**, Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders, *Lancet*, 2005, 365, 1054-1061.
- 10- **Beauchamp KL, Matheson DW, Scadden LA**, Effect of stimulus-change method on tactile-image recognition, *Percept Mot Skills*, 1971, 33, 1067-70.
- 11- **Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P, Boivin G, Melin M, Hartmann D**, Effect of micro- and macroporosity of bone

- substitutes on their mechanical properties and cellular response, *J Mater Sci Mater Med*, 2003, 14, 1089-97.
- 12- Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaissé JM, Clézardin P**, Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases, *Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases*, *Cancer Res*, 2000, 60, 2949-54
- 13- Boutsen Y, Jamart J, Esselinckx W, Devogelaer JP**, Primary prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis with intravenous pamidronate and calcium: a prospective controlled 1-year study comparing a single infusion, an infusion given once every 3 months, and calcium alone, *J Bone Miner Res*, 2001, 16,104-12.
- 14- Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A**, Intraosseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies, *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1969, 3, 81-100
- 15- Buhle EL Jr, Aebi U**, Specific labeling of protein domains with antibody fragments, *J Ultrastruct Res*, 1984 ,89,165-78.
- 16- Bui XV, Oudadesse H, Le Gal Y, Mostafa A, Pellen P, Cathelineau G**, Chemical Reactivity of Biocomposite Glass-Zoledronate, *J AUST CERAM SOC*, 2010, 46, 24-28.
- 17- Cao W, Hench LL**, Bioactive material, *Ceramic international*, 1996, 22, 493.
- 18- Chambers, Robert**, Methods for analysis by farmers: The professional challenge, *Journal for Farming Systems ResearcWExtension*, 1993a, 4, 87- 101.
- 19- Chappard C, Houillier P, Paillard M**, Bone status in primary hyperparathyroidism, *Joint Bone Spine*, 2001, 68,112-9
- 20- Chatainier S**, Évaluation de ciments à base de carbonate de calcium synthétique en comblement osseux : étude expérimentale chez le rat, thèse d'exercice, faculté de chirurgie dentaire de Toulouse, UPS (2007)
- 21- Chiba K, Adachi K**, FTY720 immunosuppressant, *Drugs Future*, 1997, 22, 18–22.
- 22- Chiba M, Teitelbaum SL, Cao X, Ross FP**, Retinoic acid stimulates expression of the functional osteoclast integrin alpha v beta 3: transcriptional activation of the beta 3 but not the alpha v gene, *J Cell Biochem*, 1996, 162, 467-75.
- 23- Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, Dudek D, Fort S, Schiele F, Zmudka K, Guagliumi G, Russell ME**,

- Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions, *Circulation*, 2003 ,108,788-94.
- 24- Cukrowski I, Ljiljana P, Werner B, Sylvia O P, Petrus H R, David C L**, Modeling and spectroscopic studies of bisphosphonate bone interactions. The Raman, NMR and crystallographic investigations of Ca HED P complexes, *Bone*, 2007, 41, 668–678
- 25- Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T**, Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells, *J Dent Res*, 1997, 76, 658-64.
- 26- Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR**, Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41, 723–749
- 27- Diaye M N', Cristinel D, Jean-Michel B, Daniel C**, Biomaterial porosity determined by fractal dimensions, succolarity and lacunarity on microcomputed tomographic images, *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33, 4 2025–2030
- 28- 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 ,23, 8-21.
- 29- Dietrich E, Oudadesse H, Girot A L, Mami M**, *In vitro* bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium, *J Biomed Mater*, 2007, 10, 1002-31901.
- 30- Dietrich E, Oudadesse H, Lucas-Girot A, Mami M**, *In vitro* bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium, *J Biomed Mater Res A*, 2009, 88, 1087-96.
- 31- Dietrich E, Oudadesse H**, Synthèse et études physico-chimiques de verres bioactifs denses et poreux. Applications en tant que biomatériaux en sites osseux, 2008.
- 32- Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M**, Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone, *J Bone Miner Res*, 1995, 10, 1666-80.
- 33- Doherty CP, Crofton PM, Sarkar MAK, Shakur MS, Wade JC, Kelnar CJH, Elmlinger MW, Ranke MB, Cutting WA**, Malnutrition, zinc supplementation and catch-up growth: changes in insulin-like growth factor I, its binding proteins, bone formation and collagen turnover, *Clinical endocrinology*, 2002, 57, 391–399

- 34- **Donnan LT, Saleh M, Rigby AS, McAndrew A**, Radiographic assessment of bone formation in tibia during distraction osteogenesis, *J Pediatr Orthop*, 2002, 22, 645-51.
- 35- **Donnell MD, Watts SJ, Law RV, Hill RG**, Effect of P₂O₅ content in two series of soda lime phosphosilicate glasses on structure and properties- PartII: Physical properties. *J. Non- Crystal. Solids*, 2008, 354, 3561-3566.
- 36- **Drebing CE, Mueller L, Van Ormer EA, Duffy P, LePage J, Rosenheck R, Drake R, Rose GS, King K, Penk W**, Pathways to vocational services: factors affecting entry by veterans enrolled in Veterans Health Administration mental health services, *Psychol Serv*, 2012 ,9,49-63.
- 37- **Dröge W**, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev*, 2002, 82, 47-95.
- 38- **Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC**, Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*, *Science*, 2007 , 315, 107-11.
- 39- **Elagli K, Hildebrand HF, Hamme G**, Biocompatibility of titanium and its alloys, *Chir Dent Fr*, 1989 , 26,35-9.
- 40- **Elizabeth A, Martini A , Jeffrey S. Buyerb , Dennis C. Bryanta , Timothy K. Hartzc , R. Ford Denisona**, Yield increases during the organic transition: improving soil quality or increasing experience?, *Field Crops Research*, 2004, 86 255–266
- 41- **Engle SJ, Womer DE, Davies PM, Boivin G, Sahota A, Simmonds HA, Stambrook PJ, Tischfield JA**, HPRT-APRT-deficient mice are not a model for lesch-nyhan syndrome, *Hum Mol Genet*, 1996, 5, 10,1607-10.
- 42- **Ennas G, Musinu A, Piccaluga G**, Structure and chemical durability of zinc-containing glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1990, 125,181-185
- 43- **Errassifi F**, Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques : Applications aux biomatériaux, Thèse, Université Cadi Ayyad Marrakech, (2011).
- 44- **Errassifi F, Menbaoui A, Autefage H, Benaziz L, Ouizat S, Santran V, Sarda S, Lebugle A, Combes C, Barroug A, Sfihi H, Rey C**, Adsorption on apatitic

- calcium phosphates: Applications to drug delivery, in *Advances in Bioceramics and biotechnologies*, Ceram Trans, 2010, 218, 159-174.
- 45- Errassifi F, Sarda S, Barroug A, Legrouri A, Sfihi H, Rey C**, Infrared, Raman and NMR investigations of risedronate adsorption on nanocrystalline apatites, *J Colloid Interface Sci*, 2014, 420, 101-111
- 46- Esterbauer H**, Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation products, *Am J Clin Nutr*, 1993, 57, 7795-7855.
- 47- Esterbauer H, Wäg G, Puhl H**, Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis, *Br Med Bull*, 1993, 49, 566-76.
- 48- Esterbauerh**, cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products, *Am J Clin Nutr*, 1993, 779-785.
- 49- Fleisch H**, Bisphosphonates: mechanisms of action, *Endocr Rev*, 1998,19, 80-100.
- 50- Flohe L, Gunzler WA**, Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol*", 1984, 105-114.
- 51- Frayssinet P, Schwartz C, Beya B, Lecestre P**, Biology of the calcium phosphate integration in human long bones, *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 1999, 9,167-170
- 52- Frayssinet P, Tourenne F, Rouquet P, Conte P, Delga C, Bonel G**, Comparative biological properties of HA plasma-sprayed coatings having different crystallinities. *J Mater Sci: Mater Med*, 1994,5,11-7.
- 53- Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, Cormier C, Bréart G, Meunier PJ, Delmas PD**, Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study, *J Bone Miner Res*, 1996,11,1531-8
- 54- Goldberg V M, Stevenson S, Feighan J, Davy D**, Biology of grit-blasted titanium alloy implants, *Clin Orthop Relat Res*, 1995, 319, 122-9
- 55- Griffith LG**, Polymeric biomaterials, *Acta Mater*, 2000, 48, 263-277.
- 56- Griffiths P R, Pariente G L**, Introduction to spectral deconvolution, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*1986, 5, 209-215
- 57- Guillemin G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen J C, Sedel L**, Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities, *J Biomed Mater Res*, 1989, 23, 765-79,.

- 58- Habibovic P, Kruyt M C, Juhl M V, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, Theilgaard N, van Blitterswijk CA**, Comparative *in vivo* study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes, *J Orthop Res*, 2008, 26, 1363-70
- 59- Hashizume M, Yamaguchi M**, Stimulatory effect of beta-alanyl-L-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Mol Cell Biochem*, 1993, 122, 59-64.
- 60- Hench LL, Paschall HA**, Histochemical responses at a biomaterial's interface, *J Biomed Mater Res Symp*, 1974, 5, 49.
- 61- Hench J, Henriksson J, Lüppert M, Bürglin TR**, Spatio-temporal reference model of *Caenorhabditis elegans* embryogenesis with cell contact maps, *Dev Biol*, 2009, 333, 1-13.
- 62- Hench LL**, Biomaterials: a forecast for the future, *J Biomed Mater Res*, 1998, 15, 41, 511-8
- 63- Hong Li, Songchao Tao, Yonggang Yan, Guoyu Lv, Yifei Gu, Xiaoman Luo, Lili Yang, Jie Wei**, Degradability and cytocompatibility of tricalcium phosphate/poly(amino acid) composite as bone tissue implants in orthopaedic surgery, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2014, 25, 1194-1210
- 64- Hopewell S, Clarke M**, How important is the size of a reprint order?, *Int J Technol Assess Health Care*, 2003, 19, 711-4.
- 65- Ignacy C, Ljiljana P, Werner B, Sylvia O. Paulb H, van R, David C L**, Modeling and spectroscopic studies of bisphosphonate–bone interactions, The Raman, NMR and crystallographic investigations of Ca–HEDP Complexes, *Bone*, 2007, 41, 668 – 678.
- 66- Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, Ito T, Isaka M, Kano T**, Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron, *Phytopathology*, 2002, 92, 542-7.
- 67- Ito T, Ozaki Y, Nakagawara J, Nakamura H, Tanaka S, Nagashima K**, A case of cervicomedullary junction tanycytic ependymoma associated with marked cyst formation, *Brain Tumor Pathol*, 2005, 22, 29-33.
- 68- Jarcho M**, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clin Orthop Relat Res*, 1981, 157, 259-78
- 69- Jason J B, Carrie LD, William F S, Douglas A A, Ohlberg J, Joshua Y, D R, Stewart R, Stanley W**, Oxide and Carbide Formation at Titanium/Organic Monolayer Interfaces, *J Am Chem Soc*, 2008, 130, 4041–4047

- 70- Jebahi S , Oudadesse H, Elleuch J, Tounsi S, Keskes H, pellen P, Rebai T, El Feki A , El Feki H** , The potential restorative effects of strontium-doped bioactive glass on bone microarchitecture after estrogen-deficiency induced osteoporosis: Physicochemical and histomorphometric analyses, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2013, 56, 533-540
- 71- Jebahi S, Oudadesse H, Elfeki H, Rebai T, Keskes H, Pollen P, Elfeki A**, Antioxidative /oxidative effects of strontium-doped bioactive glass as bone graft. In vivo assays in ovariectomised rats, *Journal of applied biomedicine*, 2012, 4, 195-209
- 72- Jiang Y, and Huang B**, Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation, *Crop Sci*, 2001, 41, 436-442
- 73- Jiri K, Monika P, Zbynek O, Lukas K, Zuzana M, Pavla H, Jana H, Tomas P, Ondrej D, Marcela T, Jaroslav H, Jarmila V, Vladimir K, Jiri D, Josef J**, Crystallization Products of Risedronate with Carbohydrates and Their Substituted Derivatives, *Molecules*, 2011, 16, 3740-3760
- 74- Joung YK, Choi JH, Park KM, Park KD**, PLGA microparticle-embedded thermosensitive hydrogels for sustained release of hydrophobic drugs, *Biomed Mater*, 2007 , 2, 269-73.
- 75- Juillard A, Falgayrac G, Cortet B, Vieillard MH, Azaroual N, Hornez JC, Penel G**, Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study, *Bone*, 2010, 47, 895-904.
- 76- Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY**, Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women, *Osteoporos Int*, 2013, 24, 23-57.
- 77- Karageorgiou V, Kaplan D**, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, 2005, 26, 5474-91
- 78- Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W**, Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo, *J Biomed Mater Res A*, 2008 ,85,777-86.

- 79- Kokubo T, Takatori Y, Ninomiya S, Sasaki Y**, Avascular necrosis of the femoral head: staging by MR imaging *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi*, 1993 ,53, 254-60.
- 80- Kos J, Pentakova M, Oktabec Z, Krejcik L, Mandelova Z, Harokova P, Hruskova J, Pekarek T, Dammer O, Tkadlecov M, Havlicek J, Vinsova J, Kral V, Dohnal J, Jampilek J**, Crystallization Products of Risedronate with Carbohydrates and Their Substituted Derivatives, *Molecules*, 2011, 16, 3740-3760.
- 81- Kotaniemi A, Piirainen H, Paimela L, Leirisalo-Repo M, Uoti-Reilama K, Lahdentausta P, Ruotsalainen P, Kataja M, Väisänen E, Kurki P**, Is continuous intranasal salmon calcitonin effective in treating axial bone loss in patients with active rheumatoid arthritis receiving low dose glucocorticoid therapy?, *J Rheumatol*, 1996, 23, 1875-9.
- 82- Kramer ED, Packer RJ, Ginsberg J, Goldman S, Thompson S, Bayer LA, Shen V, Harris R, Khan S, Finlay JL**, Acute neurologic dysfunction associated with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue for primary malignant brain tumors, *Pediatr Neurosurg*, 1997, 27, 230-7.
- 83- Laliberte JF, Brunette I, Meunier J**, 3D average human corneal models, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2004, 2, 1573-6.
- 84- Landis WJ, Jacquet R, Hillyer J, Zhang J**, Analysis of osteopontin in mouse growth plate cartilage by application of laser capture microdissection and RT-PCR. *Connect.Tissue Res*, 2003,44 ,1 28-32.
- 85- Legeros R Z, Daculsi G, Legeros JP**, Bioactive Bioceramics, *Musculoskeletal Tissue Regeneration chapitre 8*, Humana Press (2008)
- 86- Little JB, Azzam EI, de Toledo S M, Nagasawa H**, Bystander effects: intercellular transmission of radiation damage signals, *Radiat Prot Dosimetry*, 2002, 99, 159-62.
- 87- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ**, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 1951,193,265-75.
- 88- Malhi R, Gupta R, Basavaraj P, Singla A, Vashishtha V, Pandita V, Kumar JK, Prasad M**, Tobacco Control in India; A Myth or Reality- Five Year Retrospective Analysis Using WHO MPOWER for Tobacco Control, *J Clin Diagn Res*, 2015, 9, 06-9.

- 89- Mami M, Oudadesse H, Dorbez-Sridi R, Dietrich E, Rocherullé J**, Analysis of in vitro reaction layers formed on 48S4 glass for applications in biomaterial field, *Eur Phys J Appl. Phys*, 2007, 40, 189-196
- 90- Manolagas SC**, Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr Rev*, 2000, 21, 115-137.
- 91- Martin Rod A, Herbert M, Lefcourt M**, Sense of humor as a moderator of the relation between stressors and moods, *Journal of Personality and Social Psychology*, 1983, 45, 1313–1324.
- 92- Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN**, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin Biochem*, 1999, 32, 595–603
- 93- McKee K L**, Growth and physiological responses of neotropical mangrove seedlings to root zone hypoxia, *Tree Physiol*, 1996, 16, 883-889.
- 94- Melton LJ, Kyle RA, Achenbach S, Oberg A, Rajkumar SV**, Fracture risk with multiple myeloma: a population-based study, *Journal of Bone and Mineral Research*, 2005, 20, 487–493.
- 95- Mikos AG, McIntire LV, Anderson JM, Babensee JE**, Host response to tissue engineered devices, *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 33, 111-139.
- 96- Miller MC, Sood A, Spielvogel BF, Hall IH**, The Hypolipidemic and Anti-Inflammatory Activity of Boronated Aromatic Amino Acids in CF (1) Male Mice, *Met Based Drugs*, 1999, 6, 337-44.
- 97- MILTON JS, ARNOLD JC**, Introduction to Probability and Statistics, Edition McGraw-Hill, 1990.
- 98- Mitchell EP**, Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer, *Surg Technol Int*, 1998, 7, 341-9.
- 99- Miyamoto S, Kikuchi H, Nagata I, Mori K**, Anatomical and surgical note: omental graft *No Shinkei Geka*, 1993, 21, 1083-8.
- 100- Molleson T**, Trace Elements in Environmental Histoy, *Trace Elements in Human Teeth*, 1988, 10, 978-3-642-73297-3
- 101- Moonga BS, Dempster DW**, Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro, *J Bone Miner Res*, 1995, 10, 453-7.

- 102- **Moroni A, Cadossi M, Romagnoli M, Faldini C, Giannini S A**, biomechanical and histological analysis of standard versus hydroxyapatite-coated pins for external fixation, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 86B ,417-21
- 103- **Mosbah H, Andrelli F**, Bone and glucose metabolism, *Médecine des maladies Métaboliques*, 2012, 6, 311-6.
- 104- **Mosbahi S, Oudadesse H, Elfeki H, Trigui M, Wers E, Rebai T, Elfeki A, Keskes H**, Zinc-doped glass role in filling of loss of diaphyseal bone substance in NZW rabbits, *International Journal of Engineering and Innovative Technology*, 2014, 3, 2277-3754
- 105- **Mosbahi S, Oudadesse H, Wers E, Trigui M, Lefevre B, Roiland C, Elfeki H, Elfeki A, Rebai T, Keskes H**, Study of bioactive glass ceramic for use as bone biomaterial *in vivo*: Investigation by nuclear magnetic resonance and histology, *Ceramics International*, 2016, 42, 4827–4836
- 106- **Mulder TP, van der Sluys Veer A, Verspaget HW, Griffioen G, Peña AS, Janssens AR, Lamers CB**, Effect of oral zinc supplementation on metallothionein and superoxide dismutase concentrations in patients with inflammatory bowel disease, *J Gastroenterol Hepatol*, 1994, 9, 472-7.
- 107- **Mundy GR, Martin TJ**, Physiology and pharmacology of bone (Handbook of experimental pharmacology vol 107). Berlin. Springer-verlag, 1993, 107, 762 .
- 108- **Nix RN, Altschuler SE, Henson PM, Detweiler CS**, Hemophagocytic macrophages harbor *Salmonella enterica* during persistent infection, *PLoS Pathog*, 2007,3,193.
- 109- **Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y**, Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis, *J Biochem*, 2000, 351, 183–193
- 110- **Ogino M, Ohuchi F, Hench LL**, Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass, *J Biomed Mater Res*, 1980 ,14, 55-64.
- 111- **Ohura H, Ishibashi Y, Imato T, Yamasaki S**, Potentiometric flow injection determination of manganese (II) by using a hexacyanoferrate(III)-hexacyanoferrate(II) potential buffer, *Talanta*, 2003 ,60, 177-84.
- 112- **Okuma T**, Magnesium and bone strength, *Nutrition*, 2001, 17, 679-80.
- 113- **Oudadesse H**, Étude des phénomènes physiques dans la transformation du corail implanté « in-vivo » par radioactivation nucléaire, par diffraction des rayons

- X et par spectrométrie infrarouge, thèse de doctorat de l'université Clermont II (1989)
- 114- **Oudadesse H, Dietrich E, Gal YL, Pellen P, Bureau B, Mostafa AA, Cathelineau G**, Apatite forming ability and cytocompatibility of pure and Zn-doped bioactive glasses, *Biomed Mater*, 2011, 6, 035006.
- 115- **Oudadesse H, Wers E, Bui XV, Roiland C, Bureau B, Akhiyat I, Mostafa A, Chair A, Benhayoune H, Fauré J, Pellen-P**, Chitosan effects on glass matrices evaluated by biomaterial. MAS-NMR and biological investigations, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2013, 30, 1775-1783
- 116- **Packer L, Cadenas E, Kelvin J, Davies A**, Free radicals and exercise: an introduction, *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, 44, 123-125.
- 117- **Parfitt AA, Rock WP**, Orthodontic treatment planning by general dental practitioners, *Br J Orthod*, 1996, 23, 359-65.
- 118- **Park H, Temenoff JS, Tabata Y, Caplan AI, Mikos AG**, Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 2007, 28, 3217-27
- 119- **Pearson MR, Kite BA, Henson JM**, The assessment of protective behavioral strategies: comparing prediction and factor structures across measures, *Psychol Addict Behav*, 2012, 26, 573-84.
- 120- **Peitl Filho O, LaTorre GP, Hench LL**, Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5, *J Biomed Mater Res*, 1996, 30, 509-14.
- 121- **Pereira MM, Clark AE, Hench LL**, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses *in vitro*, *J Biomed Mater Res*, 1994, 28, 693-8.
- 122- **Powers SK, Lennon S L**, Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle, *Proceedings-Nutrition Society of London*, 1999, 58, 1025-1033.
- 123- **Prasad AS**, Impact of the discovery of human zinc deficiency on health, *J Am Coll Nutr*, 2009, 28, 257-65.
- 124- **Puleo DA, Nanci A**, Understanding and controlling the bone-implant interface, *Biomaterials*, 1999, 20, 2311-21.

- 125- **Quik M, Philie J, Goldstein G**, Thymopoietin, a thymic polypeptide, prevents nicotinic agonist-induced morphological changes in neonatal muscle cells in culture, *Brain Res*, 1992 , 599,117-28.
- 126- **Reffitt DM, Meenan J, Sanderson JD, Jugdaohsingh R, Powell JJ, Thompson RP**, Bone density improves with disease remission in patients with inflammatory bowel disease, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2003 ,15,1267-73
- 127- **Richards L, Ferreira DM, Miyaji EN, Andrew PW, Kadioglu A**, The immunising effect of pneumococcal nasopharyngeal colonisation; protection against future colonisation and fatal invasive disease, *Immunobiology*, 2010 ,215, 251-63.
- 128- **Robert EG, Happel LT, Kline DG**, Intraoperative nerve action potential recordings: technical considerations, problems, and pitfalls, *Neurosurgery*, 2009 ,65, A97-104.
- 129- **Roodman GD**, Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J. Clin. Invest.* 1992, 89, 46–52.
- 130- **Rosa AL, Beloti MM, Oliveira PT, Van Noort R**, Osseointegration and osseoconductivity of hydroxyapatite of different microporosities, *J Mater Sci Mater Med*, 2002 ,13,1071-5.
- 131- **Roussière H, Montavon G, Laib S, Janvier P, Alonso B, Fayon F, Petit M, Massiot D., Bouler J-M, Bujoli B**, Hybrid materials applied to biotechnologies: coating of calcium phosphates for the design of implants active against bone resorption disorders, *JMater Chem*, 2005, 15, 3869-3875
- 132- **Roux C, Confavreux CB, Cortet B, David C, Leboime A, Laroche M, Legrand E, Marcelli C, Mehzen N, Paccou J, Thomas T**, Severe osteoporosis: does structural monitoring help? *Joint Bone Spine*, 2010, 77, S113-6.
- 133- **Ruberti JW, Hallab NJ**, Strain-controlled enzymatic cleavage of collagen in loaded matrix, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336, 483-9.
- 134- **Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ**, Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy, *Osteoporos Int*, 2008, 19,733-59
- 135- **Russell RG, Rogers MJ**, Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again, *Bone*, 1999, 25, 97-106.

- 136- **Samia M, Ezzahra AF, Khadija B, Nadira K, Latifa T, Taoufik H**, Bilateral neuro-arthropathy of the ankle as a sequela of undiagnosed tabes dorsalis, *Joint Bone Spine*, 2013 ,80, 664
- 137- **Santos J D**, ceramics in medicine, *Busines briefing: Medical device manufacturing and technology* (2002), 1.
- 138- **Saravanapavan P, Jones JR, Pryce RS, Hench LL**, Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: a comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O), *JBiomed Mater Res*, 2003,66, 110.
- 139- **Sasso M, Haïat G, Yamato Y, Naili S, Matsukawa M**, Frequency dependence of ultrasonic attenuation in bovine cortical bone: an in vitro study, *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33, 1933-42
- 140- **Sawajiri M, Mizoe J, Tanimoto K**, Changes in osteoclasts after irradiation with carbon ion particles, *Radiat Environ Biophys*, 2003, 42, 219-23.
- 141- **Sentman CL, Barber MA, Barber A, Zhang T**, NK cell receptors as tools in cancer immunotherapy, *Adv Cancer Res*, 2006, 95, 249-92.
- 142- **Shuto T, Sarkar G, Bronk J, Matsui N, Bolander M**, Osteoblasts express types I and II activin receptors during early intramembranous and endochondral bone formation, *J Bone Min Res*, 1997,12, 403–411.
- 143- **Singh K, Lee K S, Lee D, Kim Y K, Kim K Ch**, Spectroscopic technique as a diagnostic tool for early detection of osteoporosis, *J Mech Sci Technol*, 2010, 24, 1661–1668.
- 144- **Siris ES**, A potent new bisphosphonate for Paget's disease of bone, *Am J Med*, 1996, 101, 339-40
- 145- **Skalak R, Branemark PI**, Deformation of red blood cells in capillaries, *Science*, 1969 , 164, 717-9.
- 146- **Skerry TM, Lanyon LE**, Immobilisation induced bone loss in the sheep is not modulated by calcitonin treatment, *Bone*, 1993, 14, 511-6.
- 147- **Skulachev VP**, Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense, *Biochemistry*, 1998 ,63,1438-40.
- 148- **Spitalier JM, Robert F, Seigle J, Amalric R**, Curative cesium therapy of small size breast cancers, 1975, 27, 2249-51.
- 149- **Sturniolo GC, Di Leo V, Ferronato A, D'Odorico A, D'Incà R**, Zinc supplementation tightens "leaky gut" in Crohn's disease, *Inflamm Bowel Dis*, 2001, 7, 94-8

- 150- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC**, A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria, A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage, *J Biol Chem*, 2001, 276, 38084–38089
- 151- Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Nakamura T**, Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium, *Biomaterials*, 2005, 26, 6014-23
- 152- Tantawi D, Armonda R, Valerio I, Kumar AR**, Management of decompressive craniectomy defects: modern military treatment strategies, 2012, 23,2042-5
- 153- Tielinen L, Lindahl JE, Tukiainen EJ**, Acute unreamed intramedullary nailing and soft tissue reconstruction with muscle flaps for the treatment of severe open tibial shaft fractures, *Injury*, 2007, 38,906-12.
- 154- Tielinen L, Lindahl JE, Tukiainen EJ**, Acute unreamed intramedullary nailing and soft tissue reconstruction with muscle flaps for the treatment of severe open tibial shaft fractures, *Injury*, 2007, 38, 906-12
- 155- Tielinen L, Lindahl JE, Tukiainen EJ**, Acute unreamed intramedullary nailing and soft tissue reconstruction with muscle flaps for the treatment of severe open tibial shaft fractures, *Injury*, 2007, 38,906-12.
- 156- Timothy M M, Josse R G 4, Jacques P B, David A H, Annie P, Mark P, Charlie H G, BensenW**, Evaluation of easily measured risk factors in the prediction of osteoporotic fractures, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2005,10.1186/1471-2474-6-47
- 157- 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.
- 158- Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A**, Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux, *Ann Med Vet*, 2004, 148, 1–13
- 159- Toworfe GK, Bhattacharyya S, Composto RJ, Adams CS, Shapiro IM, Ducheyne P**, Effect of functional end groups of silane self-assembled monolayer surfaces on apatite formation, fibronectin adsorption and osteoblast cell function, *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3, 26-36

- 160-** Vallano PT, Shugarts SB, Kline WF, Woolf EJ, Matuszewski BK, Determination of risedronate in human urine by column-switching ion-pair high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 794, 23-33
- 161-** Vitha T, Kubíček V, Hermann P, Elst LV, Muller RN, Kolar ZI, Wolterbeek HT, Breeman WA, Lukes I, Peters JA, Lanthanide(III) complexes of bis(phosphonate) monoamide analogues of DOTA: bone-seeking agents for imaging and therapy, *J Med Chem*, 2008 ,51,677-83.
- 162-** Vitte E, Derosier C, Caritu Y, Berthoz A, Hasboun D, Soulié D, Activation of the hippocampal formation by vestibular stimulation: a functional magnetic resonance imaging study, *Exp Brain Res*, 1996, 112, 523-6.
- 163-** Watts NB, Josse RG, Hamdy RC, Hughes RA, Manhart MD, Barton I, Calligeros D, Felsenberg D, Risedronate prevents new vertebral fractures in postmenopausal women at high risk, *J Clin Endocrinol Metab*, 2003 ,88, 542-9.
- 164-** Wers E, Oudadesse H, Élaboration d'un biomatériau poreux à base d'une matrice vitreuse induisant le phénomène d'ostéoinduction » - thèse de doctorat de l'Université de Rennes 1 en sciences des matériaux, Rennes, France 2014.
- 165-** Wers E, Oudadesse H, Lefeuvre B, Merdrignac-Conanech O, Barroug A, Evaluation of the kinetic and relaxation time of gentamicin sulfate released from hybrid biomaterial Bioglass-chitosan scaffolds, *Applied Surface Science*, 2015, 353, 200–208
- 166-** Widmann RF, Pelker RR, Friedlaender GE, Panjabi MM, Peschel RE, Effects of prefracture irradiation on the biomechanical parameters of fracture healing. *J Orthop Res*. 1993 May;11(3):422-8.
- 167-** Winkler C, Dornfeld S, Baumann M, Christen N, Herrmann T, Eberhardt HJ, The efficacy of radiotherapy in vertebral hemangiomas, *Strahlenther Onkol*, 1996, 172, 681-4
- 168-** Yamaguchi M, Hatefi Y, Trach K, Hoch JA, Amino acid sequence of the signal peptide of mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase as determined from the sequence of its messenger RNA, *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 157, 24-9.
- 169-** Yamaguchi T, Baba H, Fukase M, Kinoshita Y, Fujimi T, Fujita T, Degrading activity for human parathyroid hormone [PTH-(1-84)] in rat osteoblast-

- like osteosarcoma cell line UMR106, *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 141,762-8.
- 170- Yamaguchi T, Fukase M, Fujita T**, Control of parathyroid hormone-degrading activity in the opossum kidney cell: possible involvement of protein kinase C, *Biochem Biophys Res Commun*, 1988 ,157, 908-13.
- 171- Yang CH, Chen SM, Wang TL, Shieh YT**, Electrochromic Characteristics of Nitrogen-Doped Graphene/TiO₂ Nanocomposite Electrodes, *Electrochim Acta*, 2014, 123, 268–277.
- 172- You YJ, Lin JG, Ji LF**, Studies on chemical constituents of the gall of *Python molurus bivittatus* Schlegel, *Yao Xue Xue Bao*, 1992, 27, 674-8.
- 173- Yuan H, van Blitterswijk C A, de Groot K, de Bruijn J D**, A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods, *J Biomed Mater Res A*, 2006a, 78, 139-47
- 174- Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, Shi D, Liu L, Zheng Q, Gao C, Wang J**, Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds, *European Cells and Materials*, 2010, 20, 109-120

Annexes

Annexe 1

Solutions utilisées pour le dosage des protéines totales

La solution finale :

- Solution 1-----50ml
- Solution 2-----1ml
- Solution 3-----1ml

La solution 1 : Carbonate anhydre ; $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 2% dans la soude 0,1N.

La solution 2 : Sulfate de cuivre à 5% dans l'eau distillée.

La solution 3 : Tartrate double (Na et K) à 10% dans l'eau distillée.

La solution de Folin : 0,2ml diluée 2 fois par l'eau distillée.

Annexe 2

Solutions utilisées pour le dosage des TBARS :

La solution du tampon TBS : (PH = 7,4)

0,6057g de Tris (50mM) dans 100ml de Na Cl (150mM).

La solution de H Cl (0,6M) :

51,569 ml de H Cl 36% dans 1L d'eau.

La solution de Tris - TBA :

0,173g de TBA (120mM) dans 10ml de Tris (26mM).

La solution de TCA – BHT :

1g de BHT (Butyl hydroxytoluene) dans 100ml de TCA (acide trichloracétique) à 20%.

Annexe 3

Solutions utilisées pour le dosage de l'activité GPx

Le tampon d'extraction (KNaHPO₄) 67mM ; PH = 7,8 :

- Solution A ; K₂HPO₄ (0,2M) : 3,483g dans 100ml d'eau distillée.
- Solution B ; KH₂PO₄ (0,2M) : 2,721g dans 100ml d'eau distillée.
58,5ml de B + 91,5ml de A + 450ml d'eau distillée donnent 600ml du tampon KPO₄ (50mM), PH 7.
- EDTA disodique (5mM), PH 7,8 : 1,116g dans 600ml de KPO₄ (50mM).

La solution de GSH (0,1mM) :

3,073mg dans 100ml d'eau distillée.

La solution de H₂O₂ (1,3mM) :

13ul de H₂O₂ (10M) dans 100ml d'eau distillée.

La solution de TCA 1% :

1,5g dans 150ml d'eau distillée.

La solution de Na₂HPO₄ (0,32mM) :

28,65g dans 250ml d'eau distillée.

La solution de DTNB (1mM) :

3,963mg dans 100ml d'eau distillée.

Annexe 4

Solutions utilisées pour le dosage de l'activité SOD

Tampon phosphate (50mM), PH = 7,8 :

- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$: 4,476g
 - NaH_2PO_4 : 1,95g .
- } dans 250ml d'eau distillé

La solution de Na_2 – EDTA :

50mg dans 50ml de tampon phosphate.

La solution EDTA – Méthionine :

11,16ml (Na_2 – EDTA) + 580mg Méthionine et compléter à 100ml par le tampon phosphate.

La solution de NBT :

10,79mg dans 5ml de tampon phosphate.

La solution de Riboflavine :

10mg dans 100ml de tampon phosphate

Annexe 5***Solution pour l'histologie*****Solution 1: Fushine ponceau.**

Fushine acide	0,1 g
Ponceau de xylidine	0,4 g
Acide acétique glacial	3 ml
Eau distillée: compléter à	300 ml
Thymol	1 cristal
Filtrer	

Solution 2: Phosphomolybdique-Orange G.

Acide phosphomolybdique	1,5 g
Orange G	1 g
Eau distillée	100 ml
Thymol	1 cristal
Filtrer	

Solution 3: Fast green 10%(FCF).

Fast green FCF	0,1 g
Eau distillée	100 ml
Acide acétique	1 ml
Thymol	1 cristal
Filtrer	

Solution 4: BB'S.

Ethanol 95°	75%
Formaldéhyde 37 à 40%	10%
Eau distillée	15%

Solution 5: Choc hypotonique

On ajoute à 15 ml de sérum de Poulain un volume de 75 ml d'eau distillée. Ensuite 4.5 ml d'hyaluronidase testiculaire lyophilisée 250 UI reconstituée dans 5 ml de NaCl (0.9%), puis dans 6 ml de MgCl₂ à 2.033g/100g dilué au 1/6. Enfin on filtre à Ø 20µm.

Coloration H-E

1- déparaffiner, 2-Alcool (100°), 3-2 bains d'alcool (70°), 4 -rinçage à l'eau, 5- hématoxyline, 6- eau de robinet, 7- eau ammoniacale, 8- eau de robinet, 9- éosine (10min), 10- eau de robinet, 11- 2 bains d'alcool (70°), 12- Alcool (100°), 13- Toluène.

Coloration P.A.S.

1- déparaffiner, 2-hydrater, 3- rinçage à l'eau distillée, 4 -acide périodique 0.5% (30min), 5- rinçage à l'eau distillée, 6- réactif de Schiff (30 à 45min), 7- rinçage à l'eau de robinet (15 à 30min), 8- hématoxyline, 9- différencier dans l'alcool, 10- rinçage à l'eau de robinet, 11- d'alcool absolu, 12- Toluène.

Réactifs :

R1- Tampon pipes pH 7.2 : 50mmol/l + solution tampon chloro-4-phénol : 2mmol/l

R2- enzyme + Amino-4-antipyrine+ATP

R'1- Tampon magnésium

Amino-2-propanol-1 pH 10.5 :0.9mmol/l

Sulfate de magnésium : 1mmol/l

R'2- Nitro-4-phényl phosphate : 16mmol/l

Résumé

Résumé

Ce travail de thèse concerne l'évaluation biologique et physico-chimique de deux biomatériaux: verre pure associé au risédronate (46S6-xRIS) et une vitrocéramique poreuse dopée avec l'oxyde de zinc et le nitrure de titane noté 46S6-10Zn-2Ti. Le premier est un matériau hybride composé du verre (46S6) et d'un bisphosphonate le risédronate à différentes teneurs (xRIS) avec $x=8, 12$ et 20% . Le deuxième est une vitrocéramique ayant une porosité créée par l'élimination de N après calcination. Les analyses physico-chimiques après les tests *in vitro* du 46S6-xRIS montrent une modification de la cinétique de la bioactivité de ces composites selon la quantité de risédronate ajoutée au 46S6. Les analyses *in vivo* ont été aussi menées sur le 46S6-10Zn-2Ti. Cette vitrocéramique a été implantée dans des condyles fémoraux de rattes ostéoporotiques, phénomène créé par l'irradiation des rattes à différentes doses de rayons γ . L'investigation biologique après irradiation montre un déséquilibre entre la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydants. L'implantation en site osseux avec le 46S6-10Zn-2Ti a permis la restauration de cette balance. L'étude histologique montre le rétablissement du tissu osseux. Cependant, celui ci décroît avec l'augmentation de la dose des rayons gamma. Pour l'exploration physico-chimique, plusieurs techniques complémentaires ont été utilisées pour évaluer la cinétique d'ossification. La bioconsolidation de notre vitrocéramique a été également évaluée après implantation chez des lapins. Le microscanner (mCT) montre la résorption du 46S6-10Zn-2Ti et l'osséointégration des cellules osseuses dans les pores du bioimplant alors que, l'étude histologique montre que le 46S6-10Zn-2Ti est presque totalement dégradé et remplacé par le tissu osseux. Le MEB met en évidence la dégradation du 46S6-10Zn-2Ti et son remplacement par un dépôt apatitique. Les spectres MAS-RMN du ^{31}P et du ^{29}Si illustrent la dégradation progressive du 46S6-10Zn-2Ti en faveur du développement de l'apatite biologique.

Mots-clés : Bioactivité, bioconsolidation, exploration physico-chimique, investigation biologique, irradiation, porosité, verres bioactifs, vitrocéramique.

Summary

This work focused on the biological and physicochemical evaluations of two biomaterials: a bioactive glass associated to risedronate (46S6-xRIS) and a porous glass ceramic doped with zinc oxide and titanium nitride noted 46S6-10Zn-2Ti. The first is a hybrid material composed of bioactive glass (46S6) and a bisphosphonate, the risedronate with different contents (xRIS) with $x=8, 12$ and 20% . The second is a ceramic glass having a porosity, which has been created following the elimination of N after heating. Physicochemical analysis after the *in vitro* essays of 46S6-xRIS show the modification of the bioactivity kinetic of these composites proportional to the quantity of risedronate added to the 46S6. The *in vivo* analyses were also conducted in the 46S6-10Zn-2Ti. This glass ceramic was implanted in the femoral condyles of osteoporotic rats. This phenomenon was created after its irradiation at different doses of γ -rays. The biological investigations after irradiation show an imbalance between the lipid peroxidation and antioxidants enzymes. The implantation of 46S6-10Zn-2Ti in bone tissue restored the oxidative balance. The histological study manifests the restoration of bone tissue. However, this restoration decreased with the rising of γ -rays doses. For the physicochemical exploration, several complementary techniques were used to evaluate the kinetic of ossification. The porous glass ceramic was evaluated also in the bioconsolidation process after implantation in rabbit. The X-ray Micro-Computer Tomography (mCT) shows the resorption of the 46S6-10Zn-2Ti and the osseointegration of bones cells in the biomaterial pores. Moreover, the histological study illustrates that the degradation and the resorption of the 46S6-10Zn-2Ti is almost total. The SEM highlights the degradation of the 46S6-10Zn-2Ti and its replacement by an apatitic deposit. The MAS-NMR spectra of ^{31}P and of ^{29}Si illustrate a progressive degradation of 46S6-10Zn-2Ti in favor of the development of a biological apatite.

Key words:

Bioactivity, bioactive glass, bioconsolidation, biological investigation, glass ceramic, physicochemical investigation, porosity, irradiation.

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

David ALIS

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

