

*Prix du jeune chercheur de la ville de Clermont-Ferrand 2014*

Joséphine Lacroix

Elaboration par voie sol-gel de supports macroporeux à base de verre bioactif pour l'ingénierie tissulaire. Caractérisation par micro-PIXE de leurs réactivités in vitro et in vivo.

Ecole doctorale des sciences fondamentales,  
Laboratoire de Physique Corpusculaire

## Introduction

Le corps humain possède la propriété fascinante de pouvoir se réparer lui-même en cas de blessure. Toutefois, cette capacité a ses limites et dans certains cas cette réparation est impossible, l'intervention de la médecine devient alors nécessaire. Dans le cas des os, le processus naturel de réparation ne peut se faire lorsque des défauts de taille critique (littéralement des trous) apparaissent dans un os. Ces défauts peuvent provenir de pertes osseuses dues à des fractures ouvertes ou à des tumeurs osseuses. Dans ce cas, une greffe devient nécessaire et deux sources différentes de greffons différentes peuvent convenir :

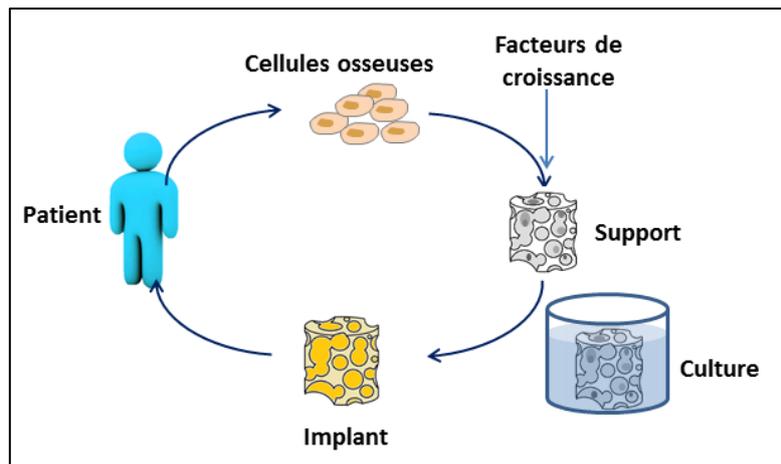
- L'allogreffe consiste à transplanter un greffon provenant d'un donneur décédé pour aider à réparer un tissu endommagé chez un patient. Cette méthode présente des risques de rejet et de contamination.
- L'autogreffe est une méthode qui consiste à prélever de l'os sur un site du patient pour le réimplanter là où se situe le défaut à réparer. Cette méthode présente la limitation évidente de la quantité qui peut être prélevée ainsi qu'une récupération plus longue pour le patient ayant subi une double intervention.

Cependant, aucune de ces deux méthodes ne répond parfaitement au besoin des chirurgiens et une nouvelle méthode est en train de se développer pour permettre l'obtention de greffons sûrs et plus facilement disponibles. Cette méthode s'appelle l'ingénierie tissulaire.

## L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est une approche qui consiste en la fabrication de greffons à partir de seulement quelques cellules d'un patient : des cellules osseuses sont prélevées sur le patient puis cultivées sur un support ayant une structure poreuse (structure avec une morphologie d'éponge/de mousse) pour qu'elles se multiplient et le colonisent (cf. Figure 1). La structure poreuse est nécessaire pour que les cellules puissent coloniser l'ensemble du support et que des vaisseaux sanguins puissent se former. La formation de ces vaisseaux est en effet essentielle à la survie des cellules osseuses puisque ce sont eux qui permettront d'apporter les nutriments.

Cette méthode permet en fait de fabriquer en laboratoire un greffon osseux parfaitement adapté au patient puisqu'il est réalisé à partir de ses propres cellules et donc sans risque de rejet. L'ingénierie tissulaire devrait permettre de concurrencer l'autogreffe.



**Figure 1: Schéma de principe de l'ingénierie tissulaire.**

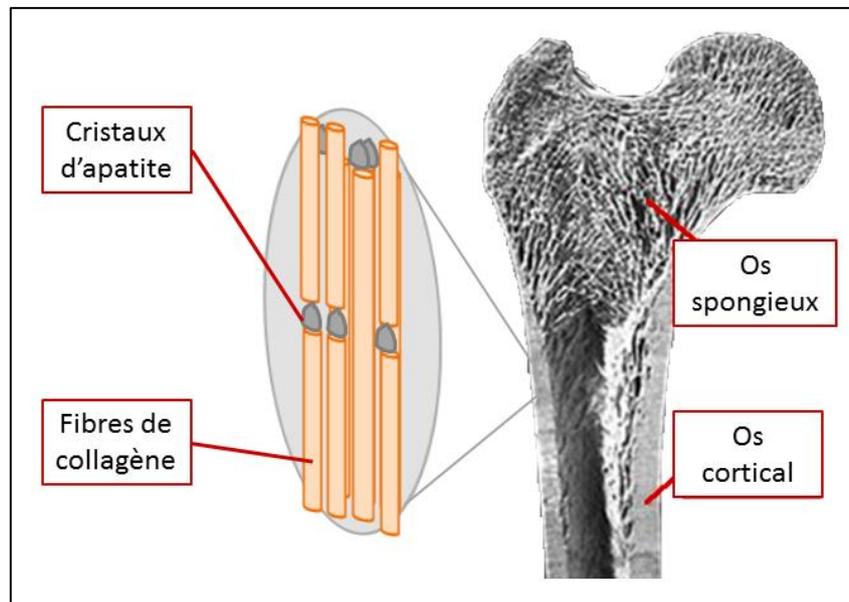
La mise au point de cette méthode nécessite un travail collaboratif de chercheurs de différentes disciplines. Les biologistes travaillent sur la détermination des facteurs de croissance, des protéines impliquées dans le contrôle de l'activité cellulaire, permettant le développement de cellules osseuses. Les physico-chimistes sont, quant à eux, concentrés sur l'élaboration et la caractérisation du support. Ce support doit être fait dans un matériau compatible avec le corps humain et avec les cellules osseuses, il doit donc être choisi dans la famille des matériaux que l'on appelle biomatériaux.

## Les biomatériaux

Les matériaux qui vont aider à réparer ou qui vont remplacer les organes ou tissus lésés sont appelés biomatériaux et regroupent un grand nombre de systèmes différents qui vont des plus fréquemment rencontrés, comme les lentilles de contact, les fils de suture ou les prothèses dentaires, jusqu'aux plus impressionnants tels que le cœur artificiel de la société Carmat qui a été implanté pour la première fois le 18 décembre dernier. De nombreux matériaux différents sont donc rencontrés dans ce genre de systèmes, leur point commun à tous étant d'être non toxiques pour le corps humain, on parle de matériaux biocompatibles, et c'est ce premier critère qui est déterminant dans le choix d'un biomatériau. Ensuite, le site d'implantation dans le corps, la durée de vie nécessaire de l'implant, l'étendue de la blessure etc. donneront d'autres critères pour le choix d'un matériau adéquat.

La réparation des os, à laquelle s'intéresse spécifiquement ce travail de thèse, nécessite l'utilisation de matériaux adaptés à ce tissu et pour les choisir il est nécessaire de bien comprendre comment sont faits les os qui ont une structure sur plusieurs niveaux. À l'échelle macroscopique (ce qui est visible) il existe deux types d'os (cf. partie droite de la Figure 2) : l'os cortical, ou compact, qui se trouve à l'extérieur des os longs (comme ceux du fémur ou du tibia) et qui compose les os plats (comme ceux du crâne) et l'os spongieux, ou trabéculaire, qui est poreux (architecture en éponge) et qui se trouve à l'intérieur des os

longs. Les os doivent avoir une bonne résistance mécanique qui est essentielle au corps humain pour se tenir debout ou se déplacer. Cette résistance vient de la structure microscopique de l'os (cf. partie gauche de la Figure 2) qui est composé de fibres de collagène, l'armature des tissus, mais surtout de cristaux d'apatite, un minéral dans lequel on retrouve le calcium des os et aussi du phosphore. Ces cristaux servent ici de renfort mécanique.



**Figure 2: Structure microscopique (gauche) et macroscopique (droite) de l'os.**

Il est intéressant de noter que l'apatite peut être synthétisée en laboratoire et, étant naturellement présente dans le corps, elle est biocompatible. L'apatite est donc utilisée comme biomatériau de l'os. Toutefois, l'apatite synthétique est lente à résorber et à être remodelée par le corps humain, elle ne sera donc jamais remplacée par de l'os. Des matériaux biodégradables, destinés à être remplacés au fur et à mesure du processus de guérison, peuvent être utilisés, c'est le cas des verres bioactifs.

Les verres bioactifs ont été découverts par Larry Hench en 1969 et présentent des propriétés très intéressantes pour la régénération osseuse. Solubles en milieu vivant, ces matériaux vont libérer des éléments chimiques aptes à stimuler le développement des cellules osseuses et engendrer le dépôt d'une couche d'apatite à leur surface (cf. Figure 3) qui va servir de support pour l'adhésion des cellules osseuses et leur développement. La formation de cette couche (analogue au minéral osseux) va permettre la formation d'une liaison entre le verre et l'os conduisant à une très bonne intégration de ce matériau. A terme, le verre bioactif sera résorbé et laissera progressivement la place à de l'os nouveau.

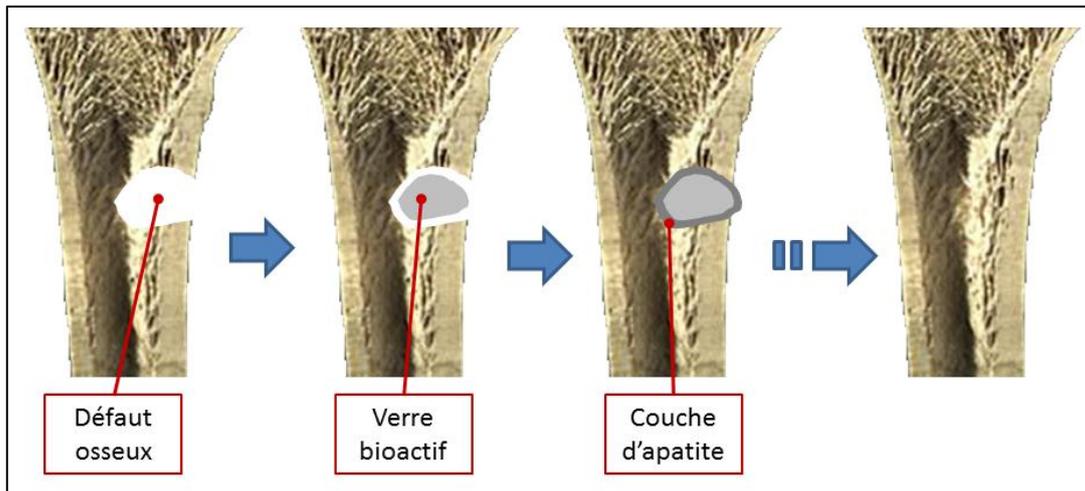


Figure 3: Schéma de l'évolution d'un défaut osseux comblé à l'aide de verre bioactif.

## Elaboration de support pour l'ingénierie tissulaire osseuse à base de verre bioactif

Pour leur très bonne affinité avec les cellules osseuses et leur capacité à les stimuler, les verres bioactifs apparaissent comme des matériaux adaptés à la réalisation de supports pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Il est donc nécessaire de pouvoir réaliser des architectures poreuses à partir de verre bioactif, pour cela le procédé de moussage sol-gel a été utilisé. Ce procédé de synthèse se base sur une voie de synthèse basse température des verres, appelée méthode sol-gel car elle prend pour point de départ une solution (sol) qui va gélifier (se solidifier) pour devenir du verre. L'idée d'adapter le procédé de moussage sol-gel aux verres bioactifs a été développé par l'équipe de Julian Jones à l'Impérial Collège de Londres. Ce procédé consiste à agiter la solution pour y incorporer des bulles d'air pendant qu'elle gélifie afin de piéger ces bulles dans le verre qui aura alors la structure d'une mousse propice à la colonisation par des cellules osseuses (cf. Figure 4).

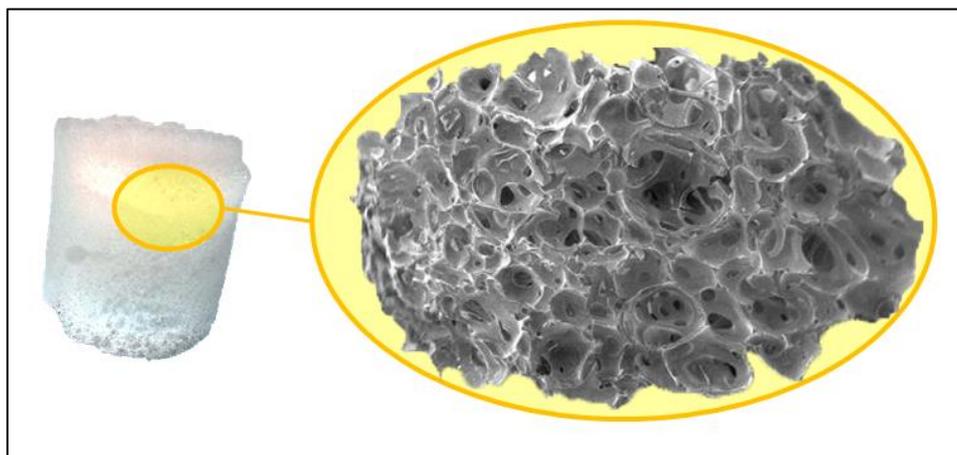
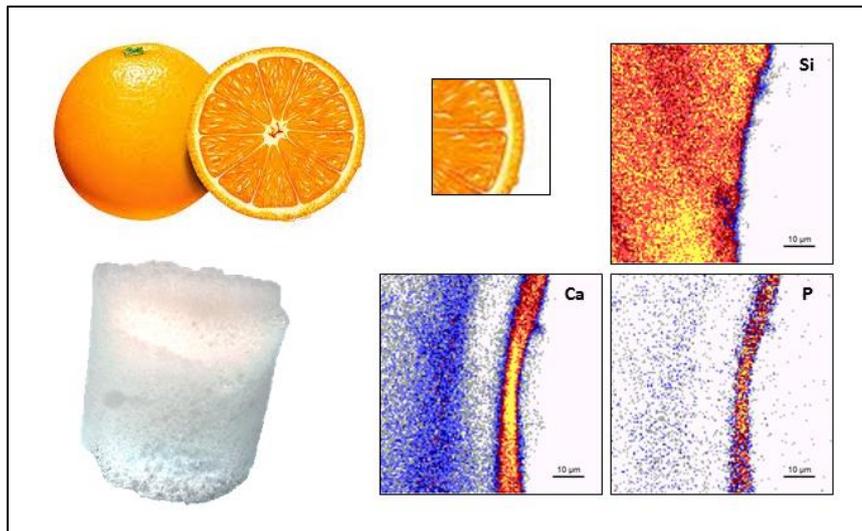


Figure 4: Structure macroscopique (gauche) et microscopique (droite) des supports obtenus par le procédé de moussage sol-gel.

## Etude des mousses de verre bioactif

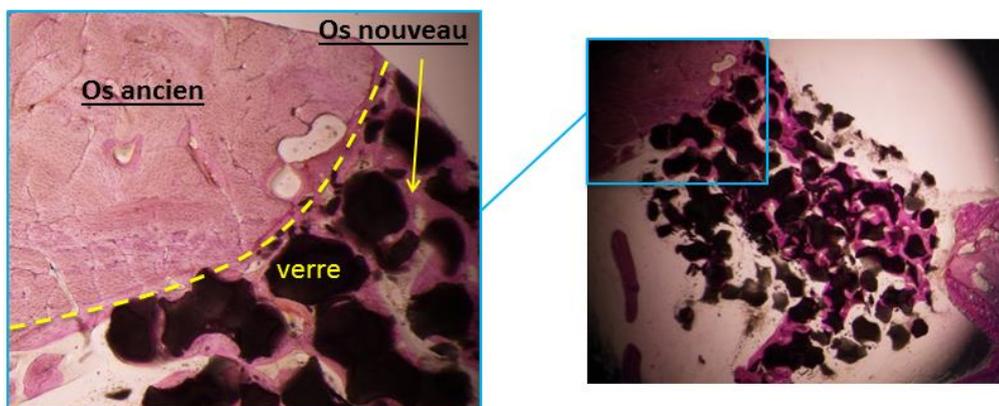
L'étude de supports pour l'ingénierie tissulaire osseuse, et plus généralement l'étude des biomatériaux, doit se faire en plusieurs étapes. La première est une étude du matériau seul par des techniques physico-chimiques qui a pour but de déterminer ses propriétés. La dernière étape de l'étude de ces matériaux destinés à être utilisés en chirurgie réparatrice doit se faire en milieu vivant pour vérifier leur non toxicité et leur efficacité. Entre ces deux étapes, et ce afin de limiter les essais sur les êtres vivants, il est possible de réaliser des essais en laboratoire. En effet, le processus qui conduit à la formation d'une couche d'apatite à la surface des verres bioactifs peut être reproduit en laboratoire dans des milieux totalement artificiels qui simulent un milieu vivant.

Cette approche a permis au cours de ce travail de thèse de comparer des mousses de verre aux propriétés différentes obtenues par le procédé de moussage et de sélectionner la mousse qui semblait la plus prometteuse pour permettre l'invasion, l'adhésion et la prolifération de cellules osseuses. Pour ce faire, une méthode d'analyse de la composition des matériaux a été utilisée grâce à une collaboration avec le Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan. Cette méthode, appelée PIXE, permet d'étudier finement la composition de la couche d'apatite qui se forme à la surface des verres bioactifs ainsi que l'évolution de leur partie interne. La Figure 5 montre comment sont réalisées les observations. De la même manière que couper une orange permet d'observer dans un même plan la peau et la pulpe, en coupant la mousse de verre qui a réagi dans un milieu biologique simulé il est possible d'étudier la couche d'apatite qui se forme à la surface (analogue à la peau) et l'intérieur du verre qui n'est pas en contact avec le milieu (analogue à la pulpe). La différence majeure qui existe entre l'intérieur et la surface de la mousse est une différence de composition, les éléments chimiques qui les composent ne sont pas les mêmes. La méthode PIXE va permettre de réaliser des cartes de répartition des éléments chimiques sur la coupe et les résultats sont montrés sur la Figure 5. Les trois cartes de répartition correspondent chacune à un élément la première est celle du silicium (Si), qui est en fait l'élément de base des verres bioactifs, il est donc présent dans l'ensemble du matériau qui correspond à la partie colorée. A la surface du matériau une couche (une peau) qui contient du calcium (Ca) et du phosphore (P), les éléments constitutifs de l'apatite, est observée. D'autres éléments, présents en plus faible quantité peuvent aussi être étudiés par cette méthode. L'utilisation de la PIXE permet donc de suivre et de mieux comprendre la formation de cette couche qui sera primordiale dans l'interaction du matériau avec les cellules osseuses.



**Figure 5: Schéma de principe de l'observation de la couche d'apatite et de l'intérieur des mousses de verre ayant réagi avec un milieu biologique.**

La mousse la plus prometteuse a ensuite été implantée dans la mâchoire d'un mouton grâce à une collaboration avec une équipe de dentistes de l'Université Paris Diderot. Un défaut (trou) a été créé et comblé avec la mousse de verre sélectionnée. La Figure 6 montre une coupe de l'interface entre la mousse de verre bioactif (en noir) et l'os (en rose) après 6 semaines. L'image de droite montre l'ensemble du défaut dont les bords sont visibles en haut à gauche et en bas à droite. La mousse de verre a été placée au centre du défaut qui ne contenait à l'origine pas d'os. Après 6 semaines, de l'os est visible jusqu'au cœur de la mousse ce qui montre sa capacité à permettre l'invasion osseuse. De plus, des analyses réalisées par la méthode PIXE ont montré un changement de composition du verre pour atteindre une composition très proche de l'apatite. La mousse de verre ainsi obtenue montre donc un comportement très prometteur vis-à-vis des cellules osseuses et semble un très bon candidat pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse.



**Figure 6: Cliché de l'interface entre une mousse de verre bioactif et de l'os 6 semaines après comblement d'un trou par la mousse de verre.**

## Améliorations du procédé de moussage et développement de nouveaux supports

La mousse de verre obtenue par le procédé de moussage montre donc des propriétés très prometteuses. Toutefois, des améliorations ou des propriétés supplémentaires ont pu être apportées au cours de ce travail:

- En profitant de la capacité des verres bioactifs à libérer les éléments qui les constituent au contact des cellules pour pouvoir les stimuler, un élément particulièrement intéressant pour la régénération osseuse a été ajouté. Cet élément chimique, le strontium, est en effet reconnu pour sa capacité à stimuler la formation osseuse. Il est d'ailleurs utilisé sous forme de médicament dans le traitement de l'ostéoporose, une maladie qui conduit à une diminution de la densité osseuse et implique un plus fort risque de fracture chez les personnes atteintes.
- Le procédé de moussage utilisé pour l'élaboration des mousses de verre bioactif fait appel à un réactif hautement toxique qui implique un risque pour l'opérateur de la synthèse. Au cours de ce travail, un réactif alternatif non toxique a été proposé pour tenter de résoudre ce problème.

Les mousses de verre obtenues présentent des propriétés très intéressantes cependant, leurs relativement faibles propriétés mécaniques risquent de limiter leurs applications et constituent leur point faible. Afin de pallier ce problème, une autre voie de synthèse de supports à base de verre bioactif a été mise au point. Dans cette nouvelle voie, de la poudre de verre bioactif est dispersée dans une phase organique, de la gélatine, afin d'obtenir un support à la structure plus proche de celle de l'os qui se compose d'une phase organique et d'une phase minérale. Ce matériau, appelé composite, a montré des propriétés mécaniques améliorées tout en conservant les propriétés du verre bioactif de favoriser le développement et l'adhésion des cellules osseuses.

## Conclusion et perspectives

De nombreuses perspectives tant du point de vue de l'amélioration des techniques de caractérisation que du point de vue de l'amélioration des matériaux se dégagent de ce travail. Toutefois, ce travail de thèse a donné lieu à la réalisation de supports très prometteurs pour l'ingénierie tissulaire osseuse qui demandent maintenant à être étudiés et comparés par des essais *in vivo* plus poussés. Il reste à vérifier leur efficacité à servir de support pour l'adhésion et la croissance de cellules osseuses, puis l'efficacité du greffon ainsi obtenu à permettre la réparation de défauts osseux que le corps ne peut guérir seul.