

Elaboration de verres bioactifs pour des applications en tant que biomatériaux

H. Oudadesse

Groupe Biomatériaux
Université de Rennes 1

UMR-CNRS 6226
Sciences Chimiques de Rennes



Plan

1. Introduction
2. Synthèse: verre purs et verre –Chitosane
3. Caractérisations physico-chimiques avant et après tests “in vitro”
4. Expérimentations « in vivo »
5. Conclusion

Biomatériaux de comblement osseux



Greffes osseuses naturelles:

- *Risques de transmission de virus

Biomatériaux Synthétiques

- * Phosphates de calcium
- * Carbonate de calcium
- * Composites géopolymères- phosphate de calcium
- * **Verres bioactifs**

Verres bioactifs

Système: $\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$



Bioactivité: formation d'une couche d'hydroxyapatite (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ après contact avec un milieu physiologique



Hydroxyapatite **similaire** à la phase minérale de l'os

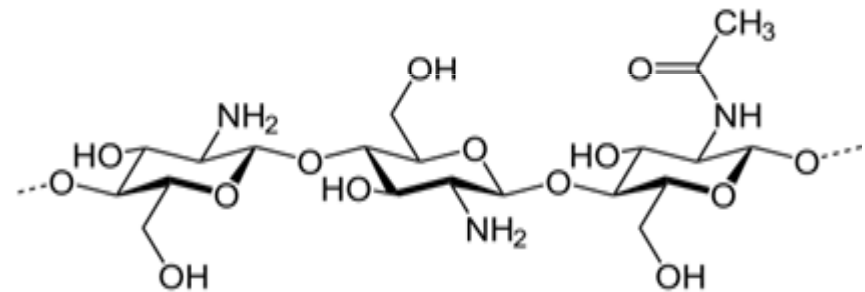


Formation des **liaisons chimiques** entre l'implant et l'os naturel

Chitosane

Propriétés biologiques préventives et/ou curatives

- Bio-polymère naturel
 - biocompatibilité,
 - biodégradabilité,
 - Activité anti-tumorale,
 - Anti-inflammatoire,
 - Accélération de la cicatrisation des plaies
 - Attachement, différenciation, morphogénèse des cellules osseuses



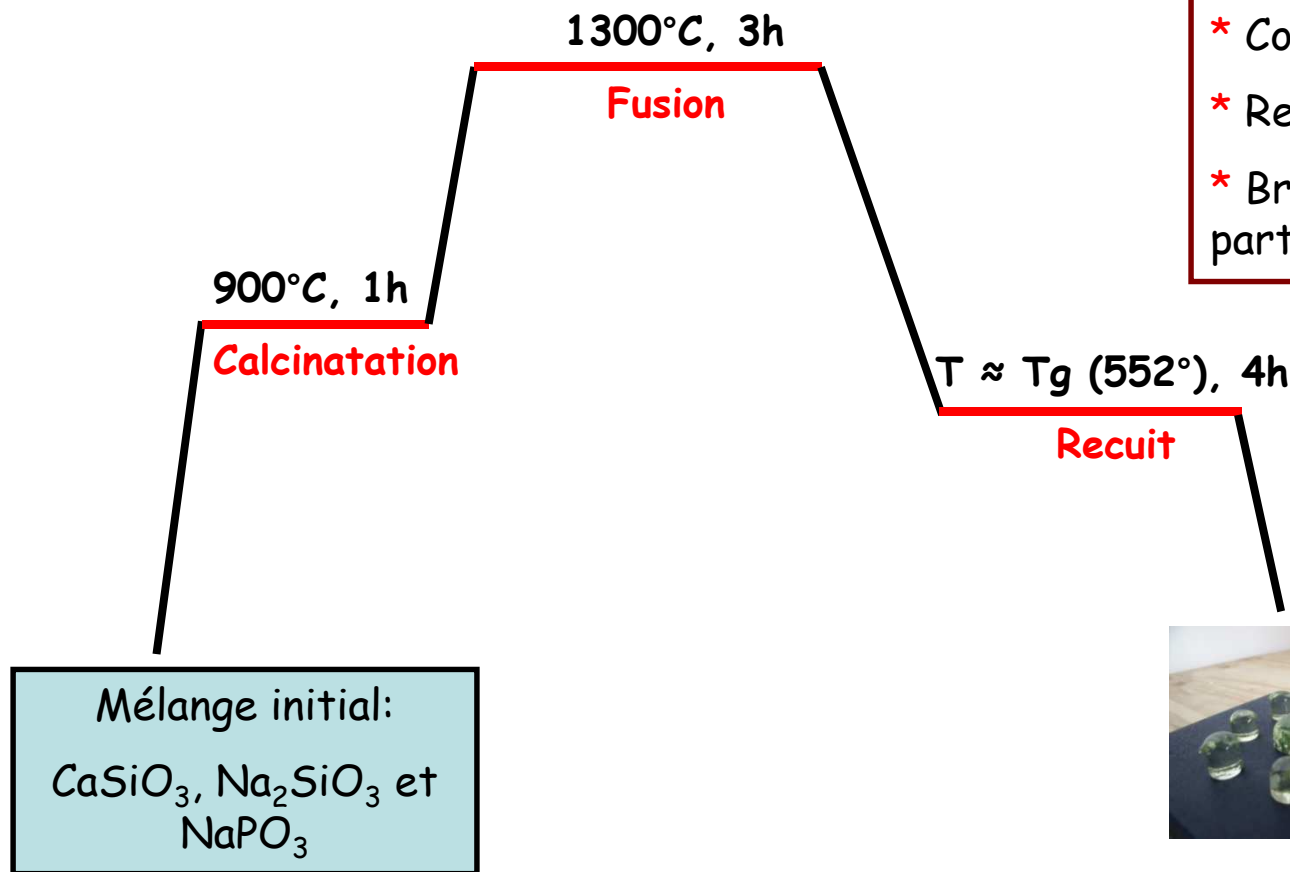
Formule chimique du chitosane

Association verre bioactif - chitosane

Synthèse du verre bioactif 46S6

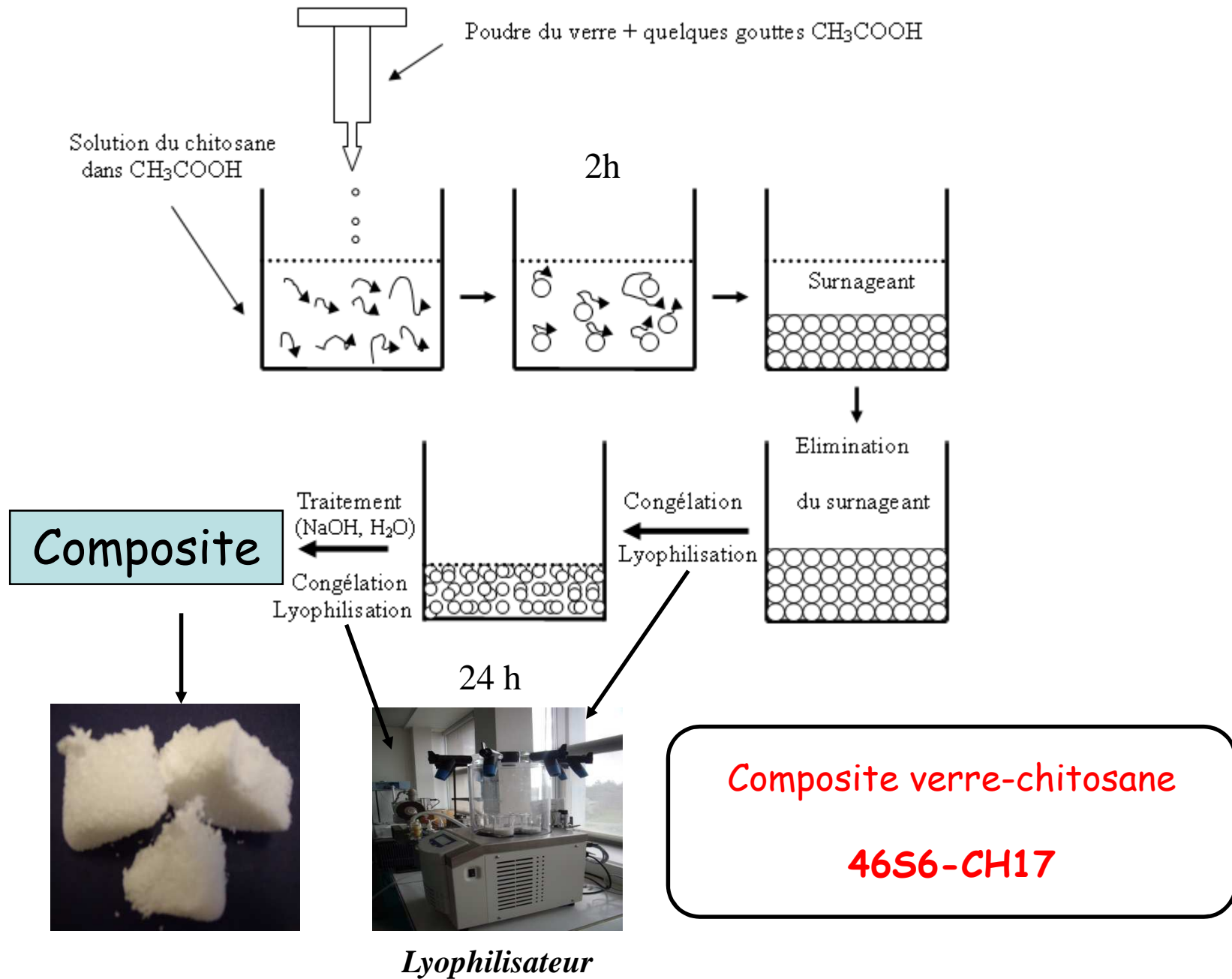
% massique	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅
46S6	46	24	24	6

- * Préparation du mélange de poudres
- * Calcination, puis fusion
- * Coulée dans des moules
- * Recuit
- * Broyage pour obtenir des particules inférieurs à 40 μm



Verres massifs

Synthèse du composite verre-chitosane



Expérimentations "in vitro"

	Concentrations ioniques $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$						
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	148,8	4,2	1,0
Plasma sanguin	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0

-Synthèse du SBF (Simulated Body Fluid)

-Immersion des poudres du verre et du composite synthétisé

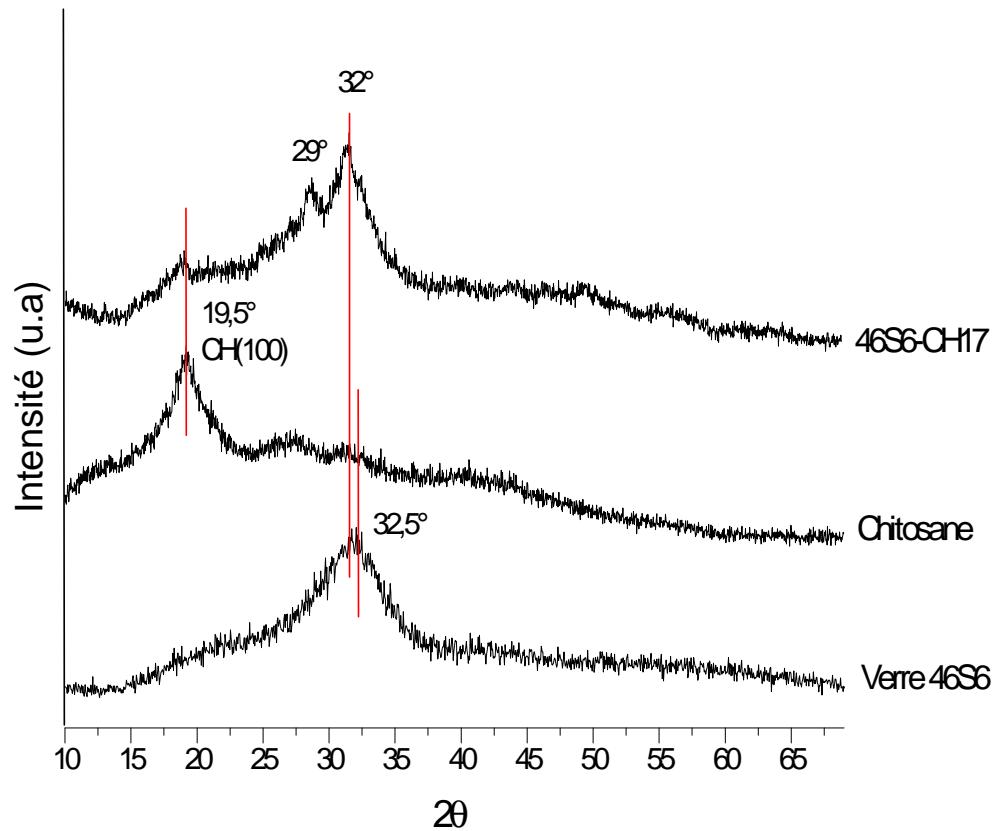
-Délais d'immersion: 1, 3, 7, 15 et 30 jours.

- Echantillons maintenus à 37° sous agitation contrôlée (50 tours/min)



Incubateur

Caractérisations du verre et composite verre-chitosane: 46S6-CH17 avant immersion



Composite verre-chitosane:

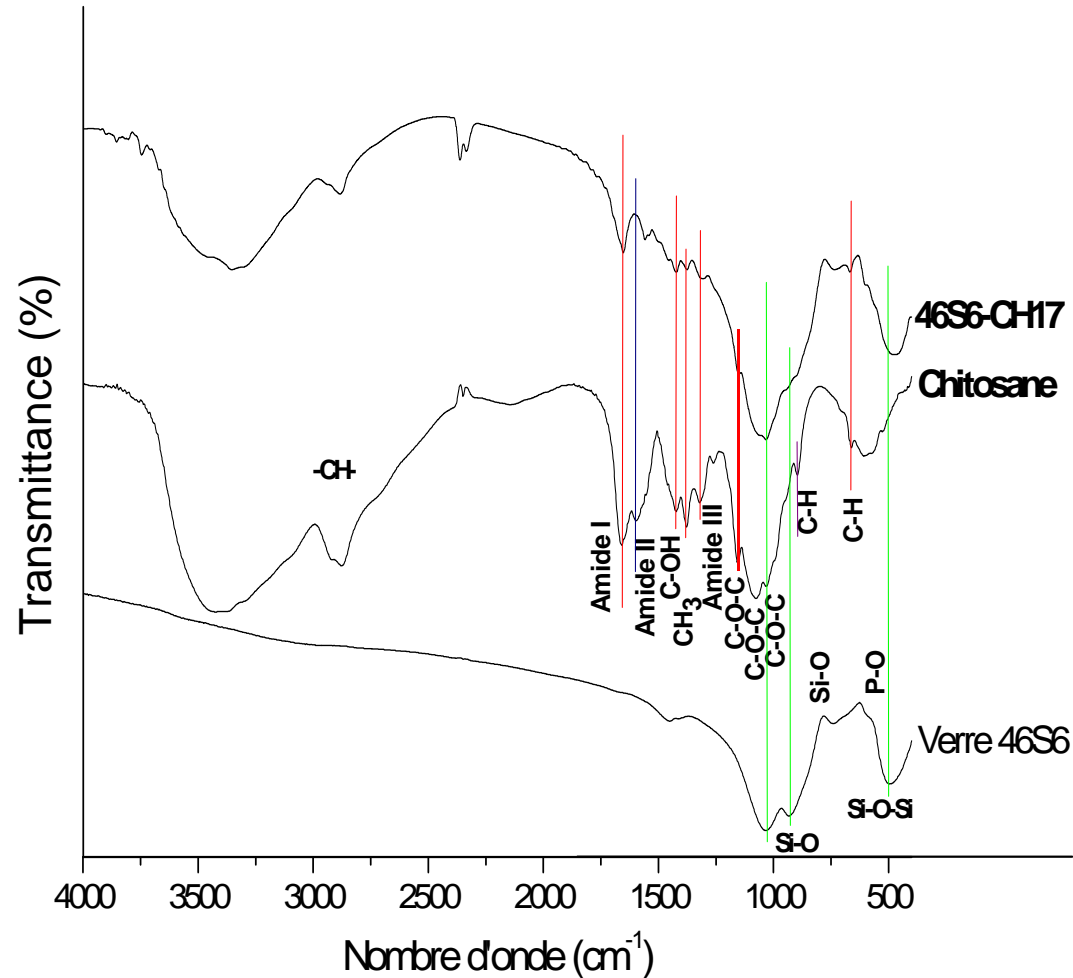
-Présence de raie caractéristique du chitosane

- Une nouvelle raie à 29° dans le 46S6-CH17



Interactions entre le verre et le chitosane

FTIR: verre et composite verre-chitosane avant immersion



Verre 46S6:

- Un réseau de silice
- Présence de phosphate

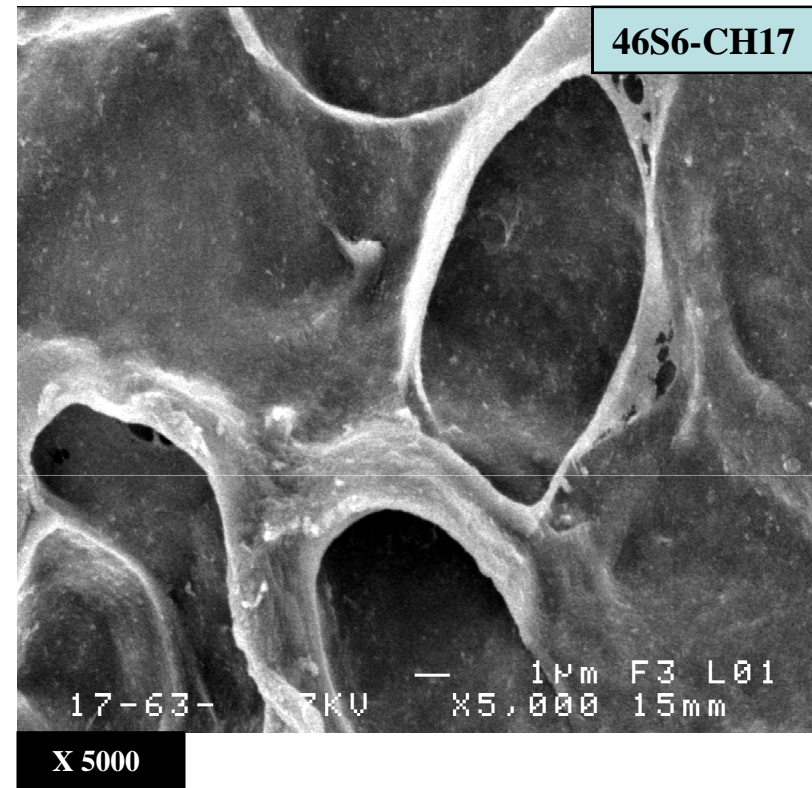
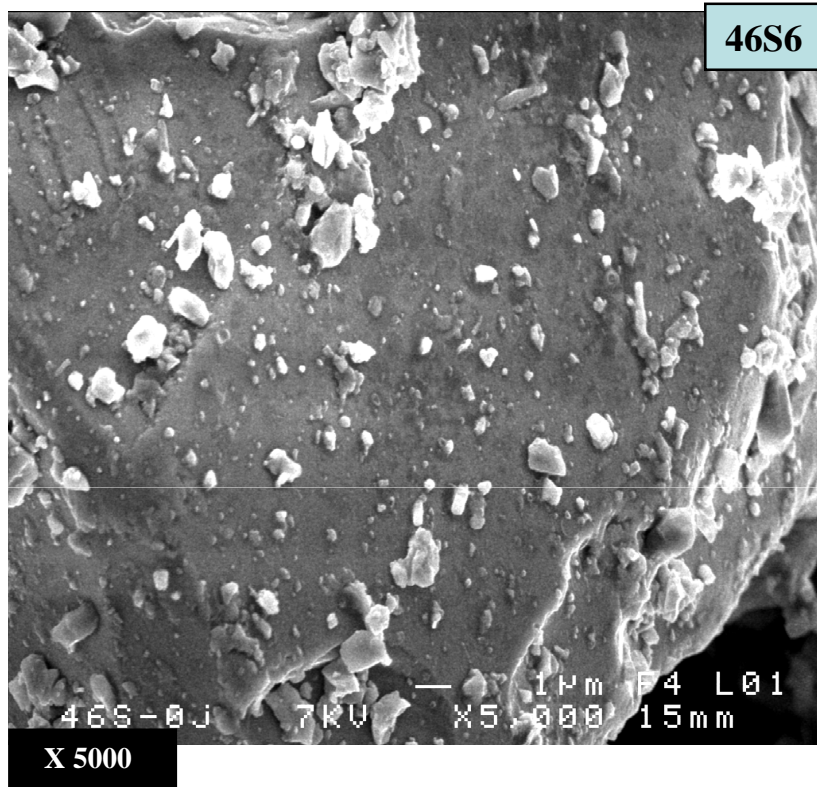
Composite verre-chitosane:

- Présence de bandes caractéristiques du chitosane et du réseau vitreux
- Déformation, déplacement, disparition de quelques bandes



- Liaisons entre le verre et le chitosane dans la structure du composite synthétisé

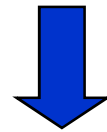
*Morphologie du verre et du composite verre-chitosane
avant immersion*



- Le verre présente une surface lisse
- Le composite synthétisé présente une structure poreuse

- Surface spécifique par la méthode B.E.T
- Taux de porosité du composite synthétisé par la méthode de déplacement du liquide

Valeurs	46S6	Chitosane	46S6-CH17
Surface spécifique (m ² /g)	0,9	0,7	14,9
Taux de porosité (%)	-	-	81

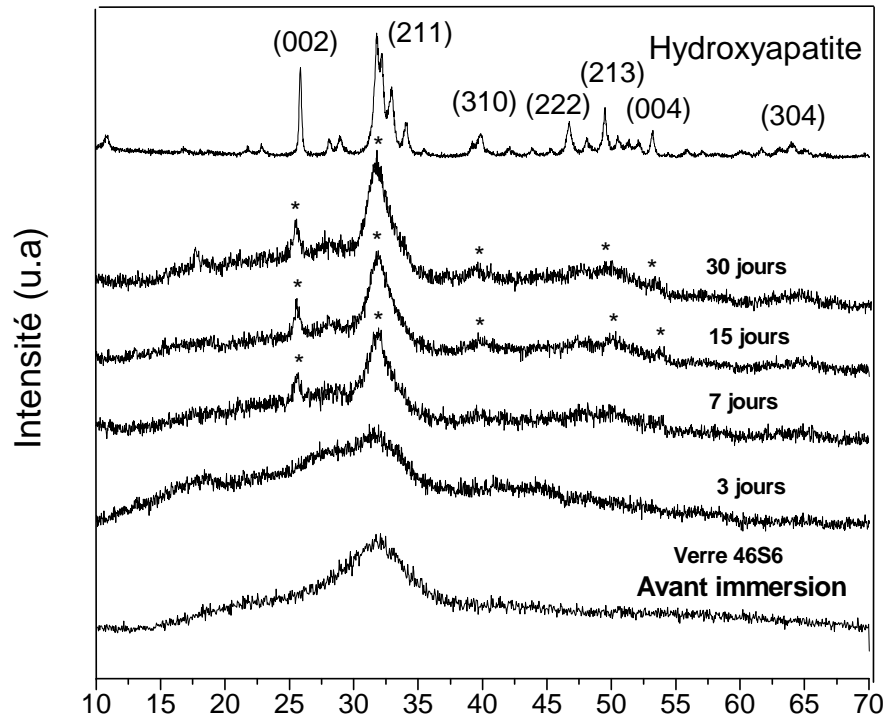


Composite verre-chitosane 46S6-CH17 présente:

- une grande surface spécifique
- un grand taux de porosité par rapport au verre initial et au chitosane

Caractérisations du verre et du composite verre-chitosane: 46S6-CH17 après immersion

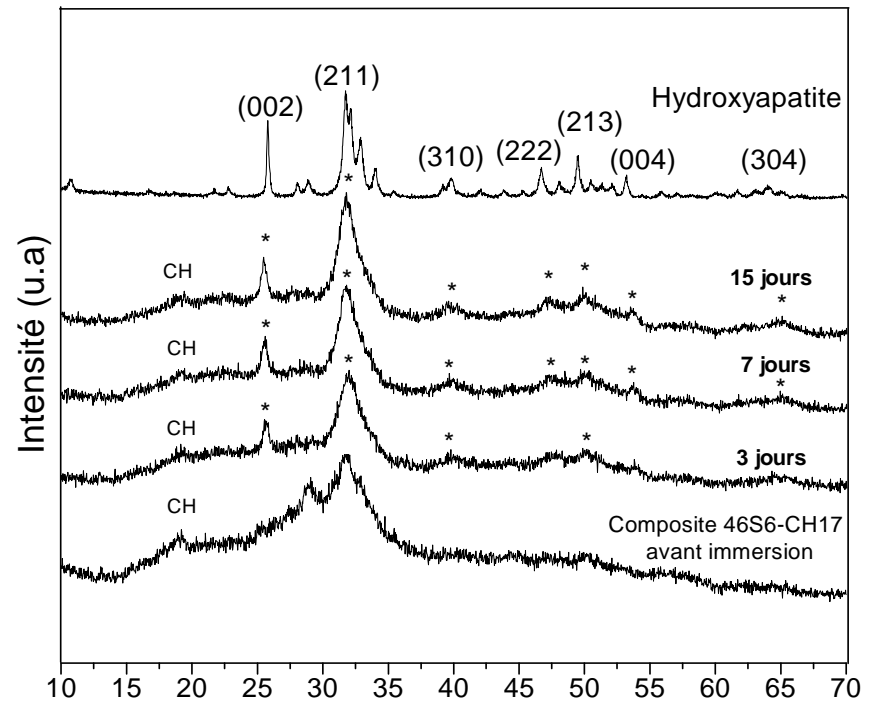
Le verre pur



↓ 2θ

- Apparition des raies d'apatite après **7** jours d'immersion

Le composite 46S6-CH17

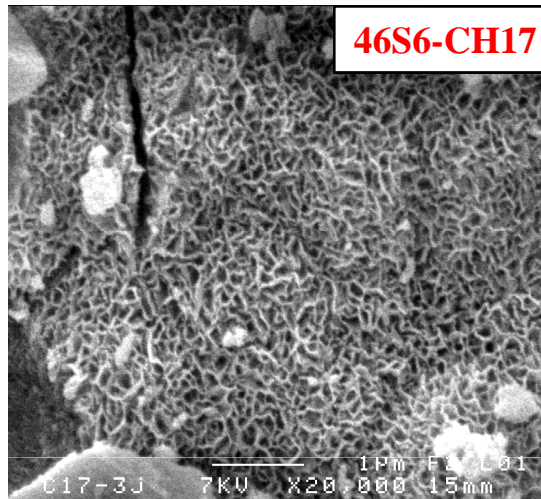
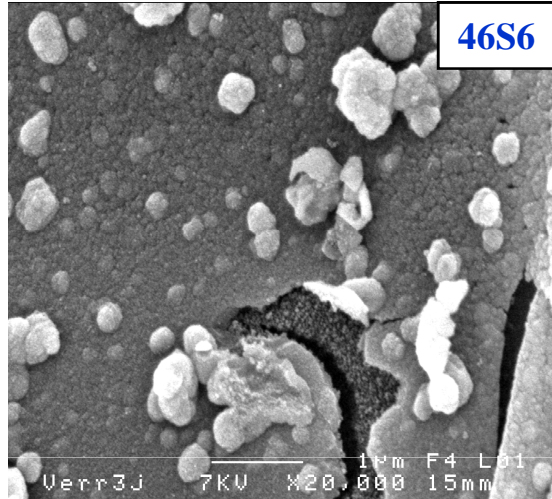


↓ 2θ

- Présente des raies d'apatite après **3** jours
- Apparition de toutes les raies après **15** jours

Morphologie: verre et composite verre-chitosane après immersion

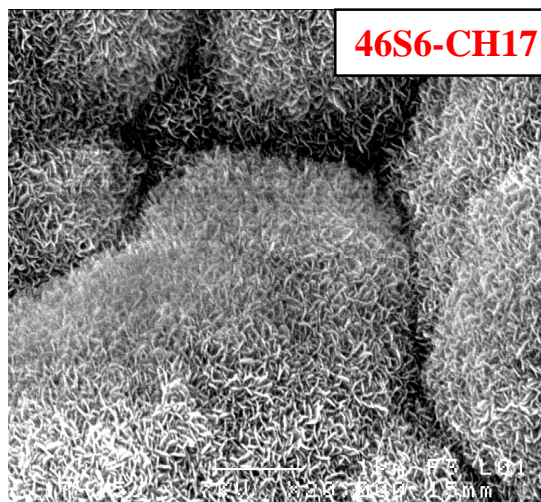
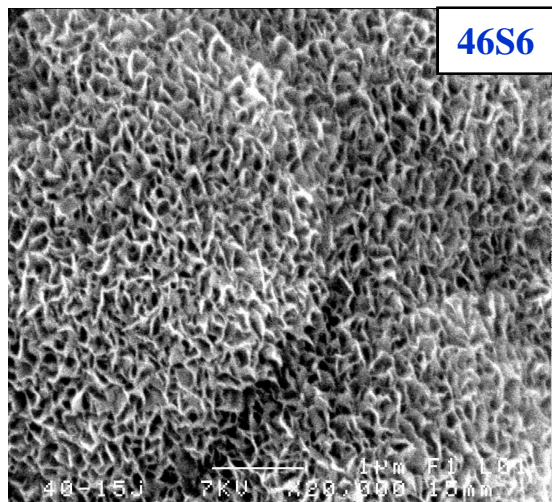
3 jours



Après 3 jours d'immersion:

- Formation d'une couche d'apatite sur la surface du composite

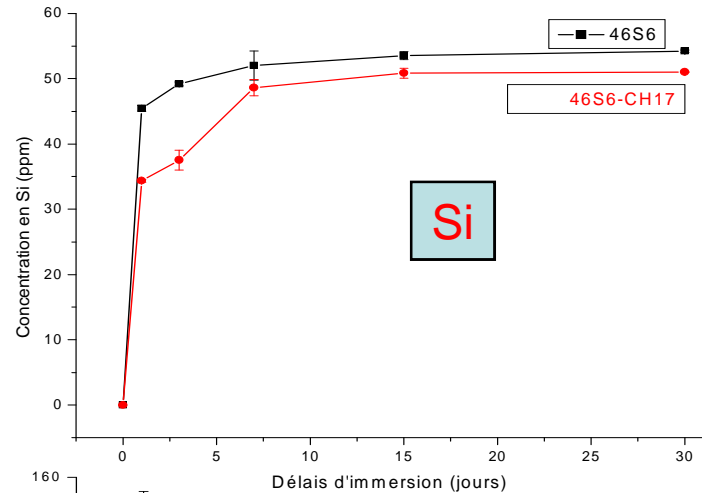
15 jours



Après 15 jours d'immersion:

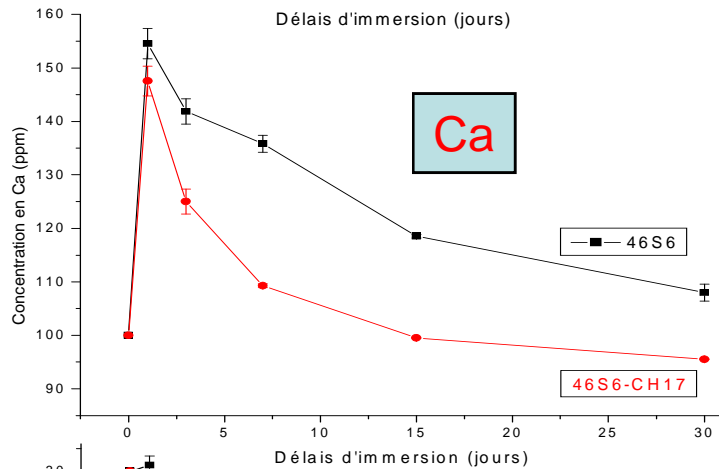
- La couche d'HA formée à la surface du composite est plus dense

Echanges ioniques: Analyse des solutions SBF par ICP-OES



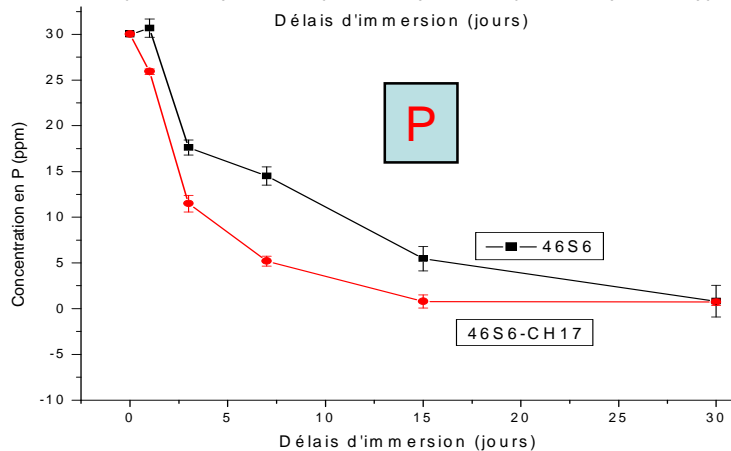
La présence du chitosane dans le composite :

- ralentit le relargage du Si



- ralentit le relargage du calcium vers le SBF

- accélère la consommation du Ca et du P par le composite verre-chitosane pour former une couche d'apatite

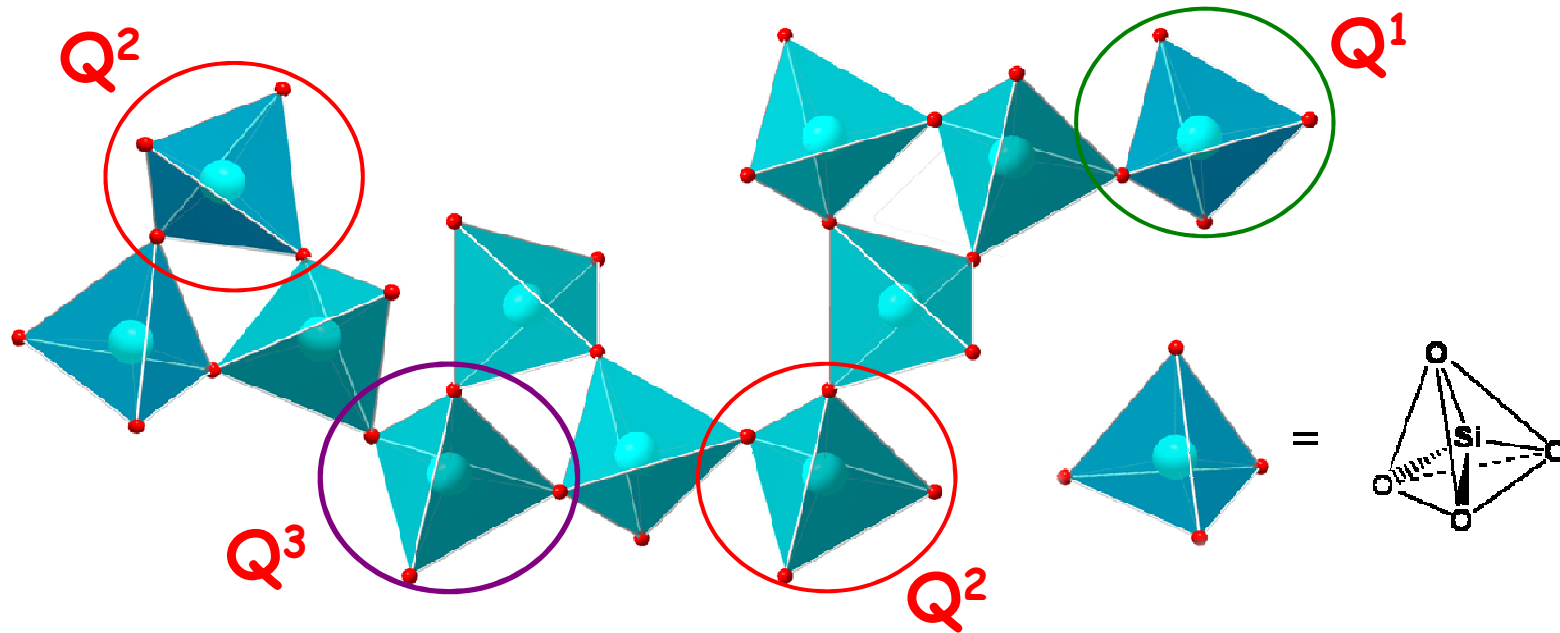


*Etude par RMN du Solide,
de la structure du verre et du composite verre-chitosane*

- Modèle structural d'un verre de silice:



Réseau de tétraèdres SiO_4

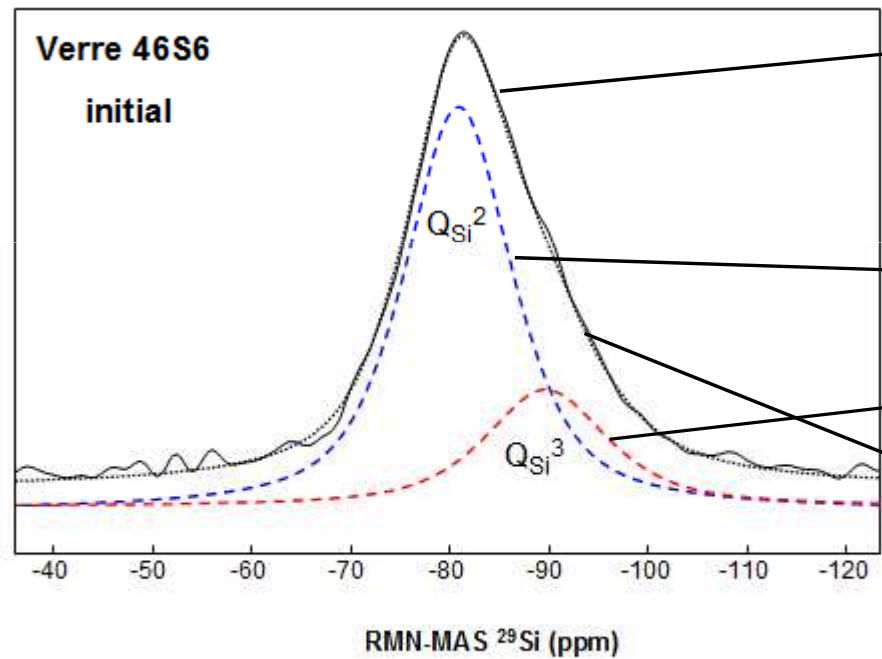


Q^n , n: nombre d'oxygènes pontants

*Etude par RMN du Solide,
de la structure du verre et du composite verre-chitosane*

RMN du Solide: ^{29}Si

Verre pur 46S6
avant immersion



Spectre initial

Après déconvolution:

$\text{Q}_{\text{Si}}^2 \rightarrow \delta \approx -80 \text{ ppm (80\%)}$

$\text{Q}_{\text{Si}}^3 \rightarrow \delta \approx -89 \text{ ppm (20\%)}$

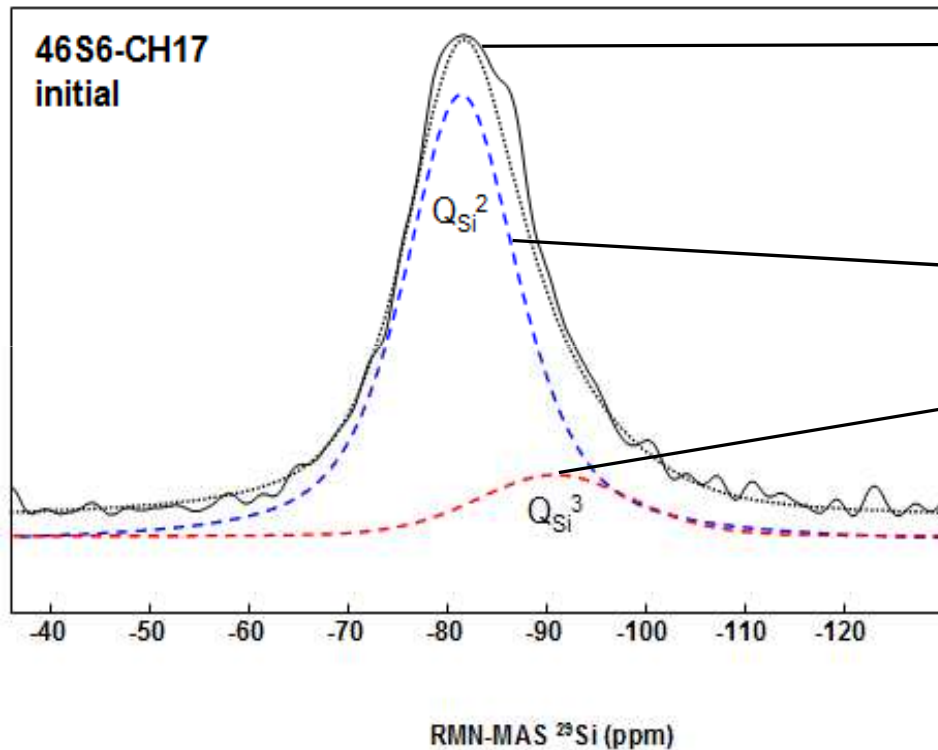
Pointillé: Somme de deux
résonances



- Verre 46S6 caractérisé par des
tétraèdres SiO_4 : Q_{Si}^2 et Q_{Si}^3

RMN du Solide du composite verre-chitosane: ^{29}Si

Composite 46S6-CH17
avant immersion



Spectre initial

Après décomposition:

$\text{Q}_{\text{Si}}^2 \rightarrow \delta \approx -81,5 \text{ ppm (87,6\%)}$

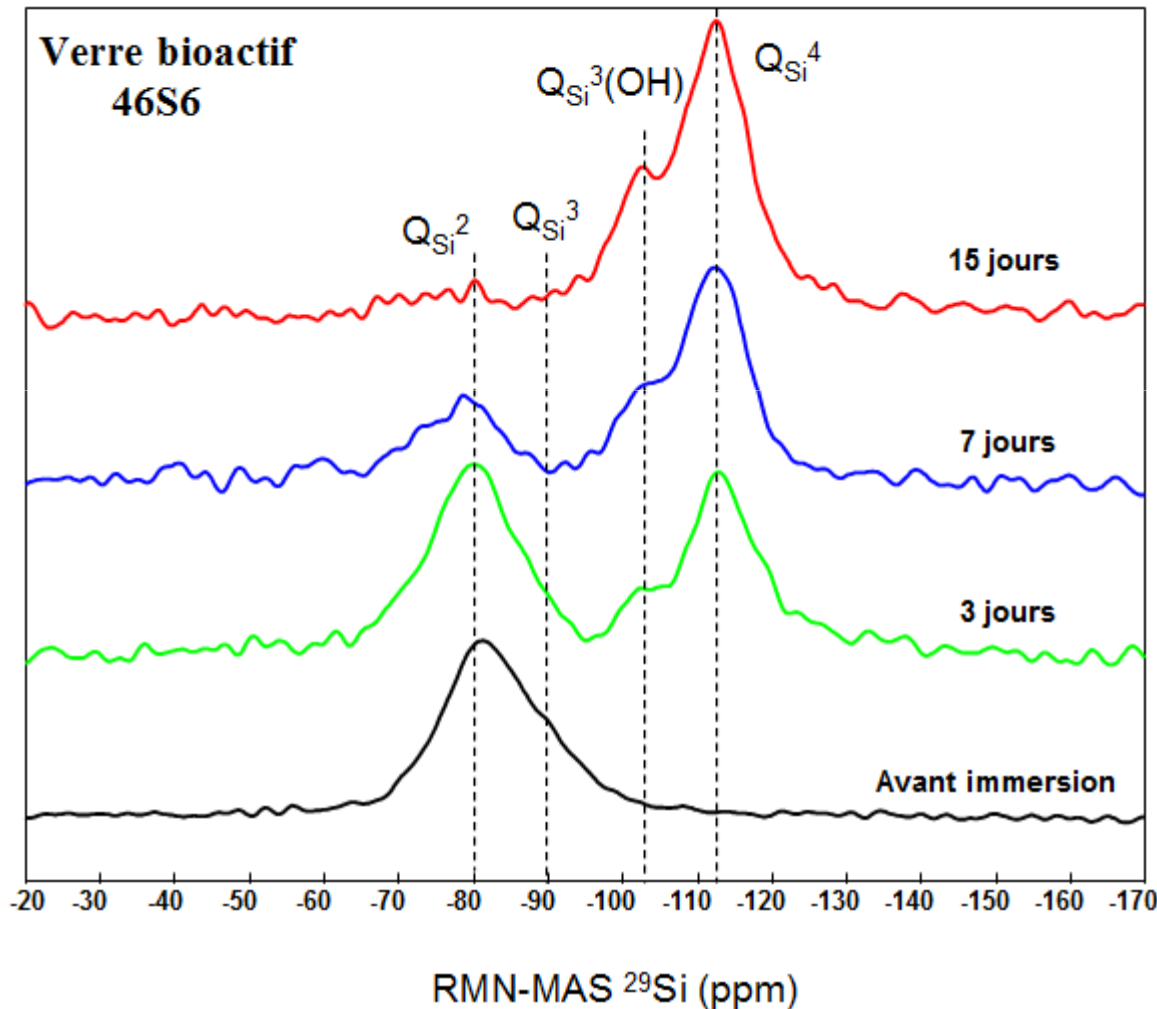
$\text{Q}_{\text{Si}}^3 \rightarrow \delta \approx -89,9 \text{ ppm (12,4\%)}$

« Q_{Si}^3 dans le verre initial: 20% »



L'effet du chitosane:
Transfert de Q_{Si}^3 à Q_{Si}^2

Verre pur après immersion

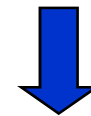


Après immersion dans le SBF:

- Apparition de 2 nouvelles espèces:

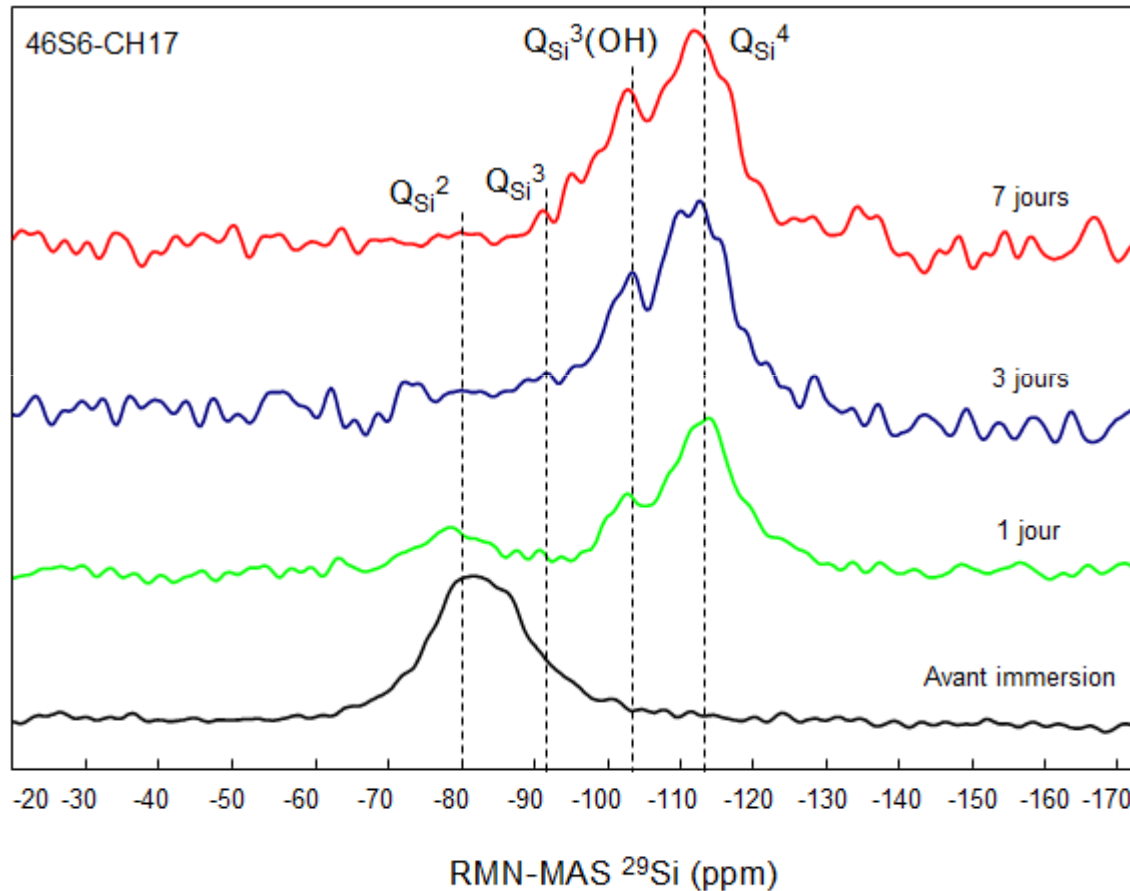
$\text{Q}_{\text{Si}}^3(\text{OH})$ ($\delta = -103$ ppm)

Q_{Si}^4 ($\delta = -112$ ppm).



Caractéristique de la dissolution de la matrice du verre 46S6

Composite verre-chitosane après immersion



-Apparition de 2 nouvelles espèces en ^{29}Si :

$Q_{\text{Si}}^3(\text{OH})$ et Q_{Si}^4

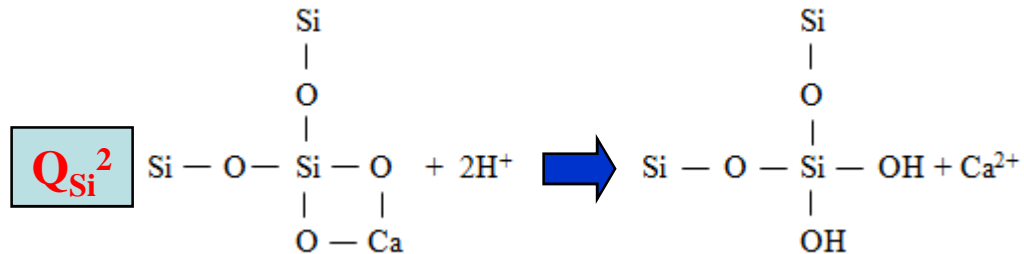
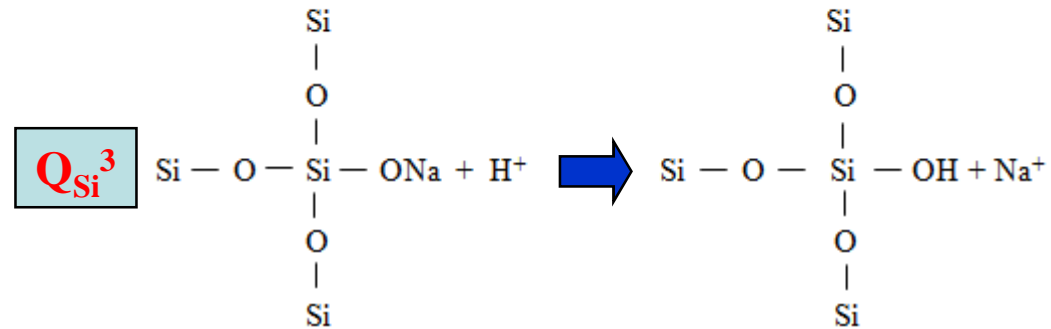


- Caractéristiques de la dissolution de la matrice vitreuse dans le composite 46S6-CH17

Après 3 jours: Les quantités $Q_{\text{Si}}^3(\text{OH})$ et Q_{Si}^4 sont plus importantes dans le 46S6 -CH17 que dans le 46S6

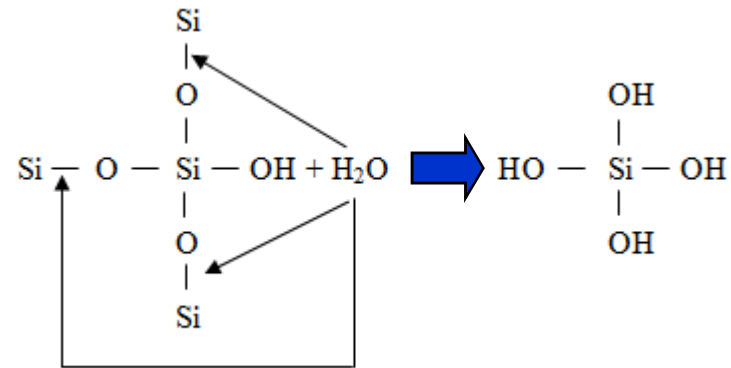
Réactions chimiques de la matrice du verre après immersion dans le liquide SBF

1- Echange rapide des ions Ca^{2+} , Na^+ dans le verre avec des protons H^+ du liquide SBF pour former les groupes silanols Si-OH .

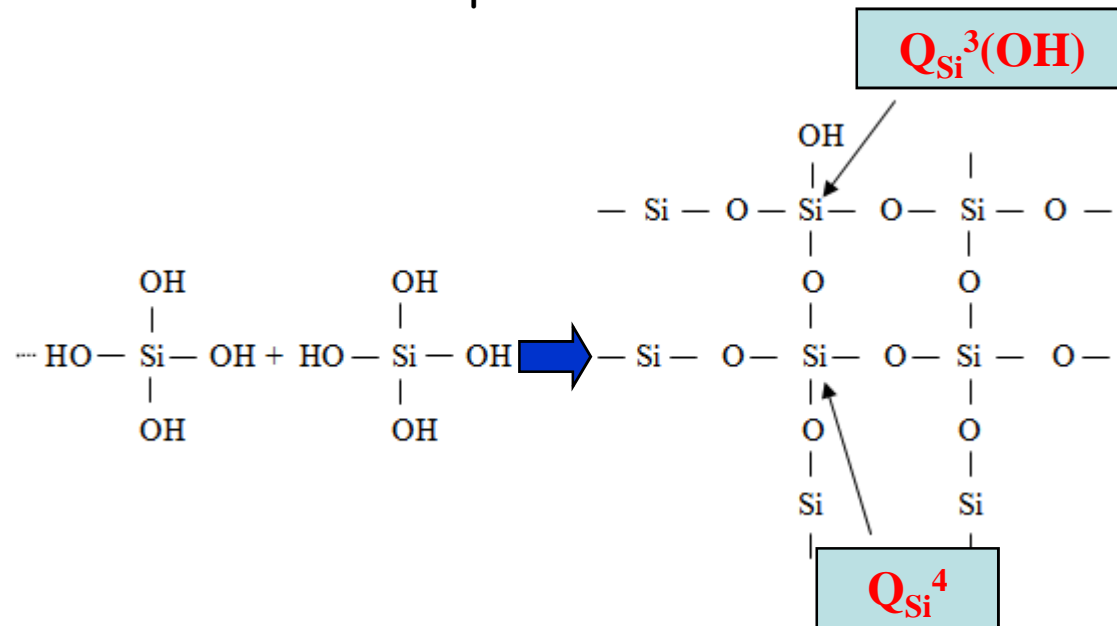


2- Rupture des liaisons Si-O-Si.

Formation des groupes silanols Si-OH à l'interface verre / solution.

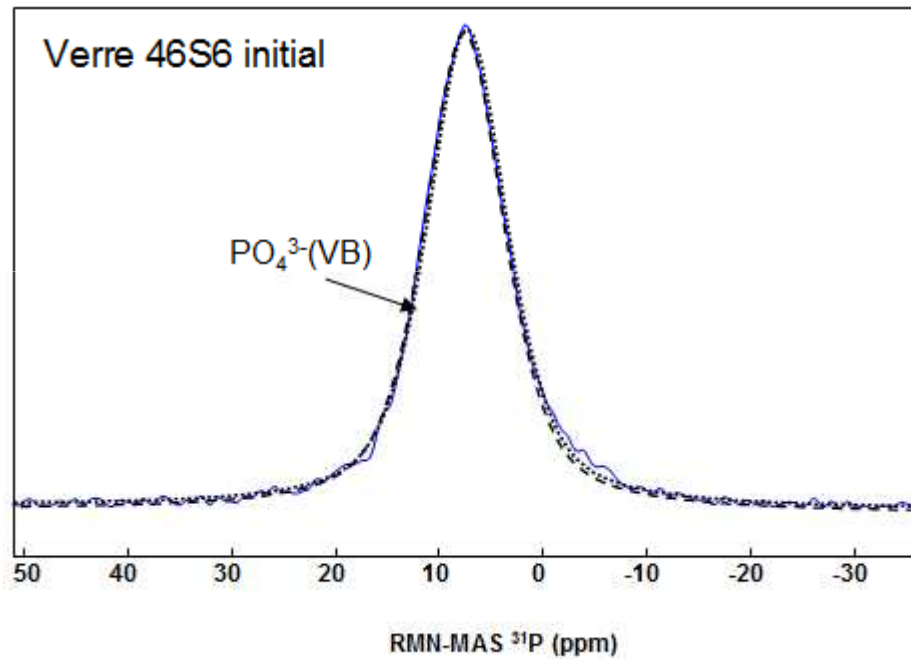


3- Condensation et repolymérisation des groupes silanols pour former une couche riche en silice à la surface du verre pur.



RMN du Solide: ^{31}P

Verre 46S6
avant immersion

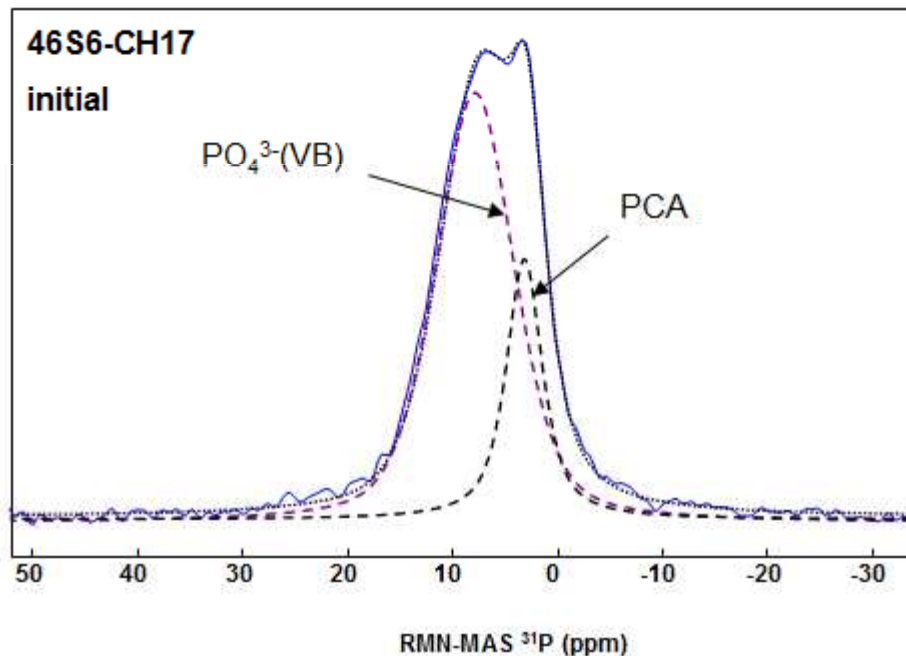


Pour le verre initial:

- Une seule composante PO_4^{3-} isolée dans un environnement orthophosphate Q^0 : pas d'oxygène pontant entre des tétraèdres PO_4^{3-}

RMN du Solide, composite verre-chitosane: ^{31}P

Composite 46S6-CH17 avant immersion

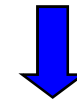


Composite verre-chitosane initial:

- Présence de deux composantes:

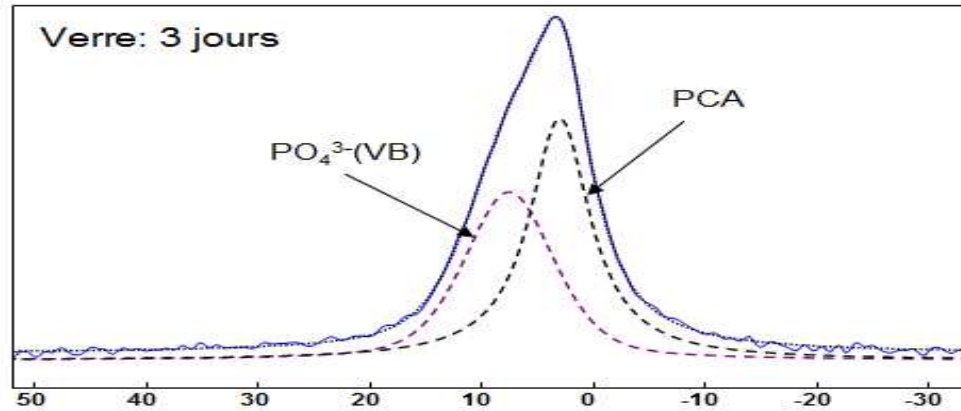
* $\text{PO}_4^{3-}(\text{VB})$ comme dans le verre initial

* PCA : un phosphate de calcium amorphe



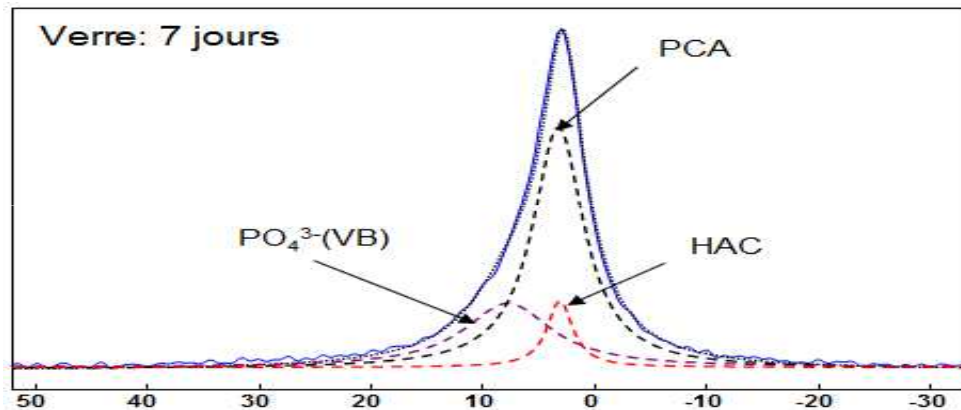
Effet du chitosane sur la structure du composite synthétisé

Verre 46S6 après immersion: ^{31}P



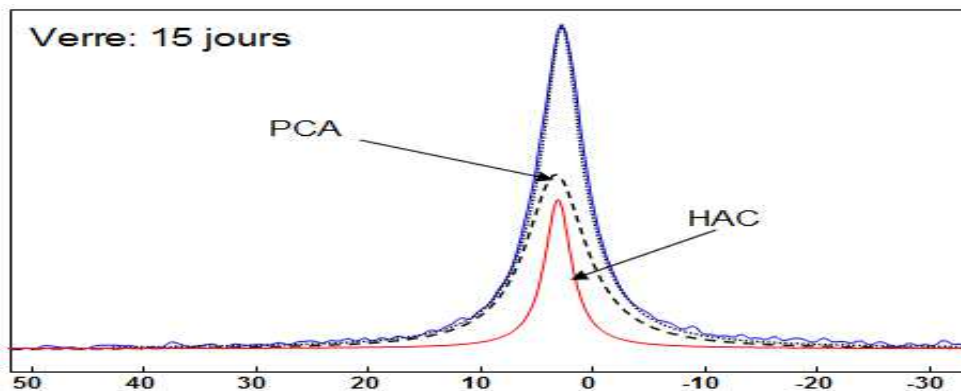
Après 3 jours:

- Diminution des espèces PO_4^{3-}
- Apparition d'une nouvelle composante caractéristique d'un phosphate de calcium amorphe (PCA).



Après 7 jours:

- Une diminution des espèces PO_4^{3-}
- Evolution de la composante PCA
- Apparition d'une nouvelle composante caractéristique d'HA carbonatée (HAC)

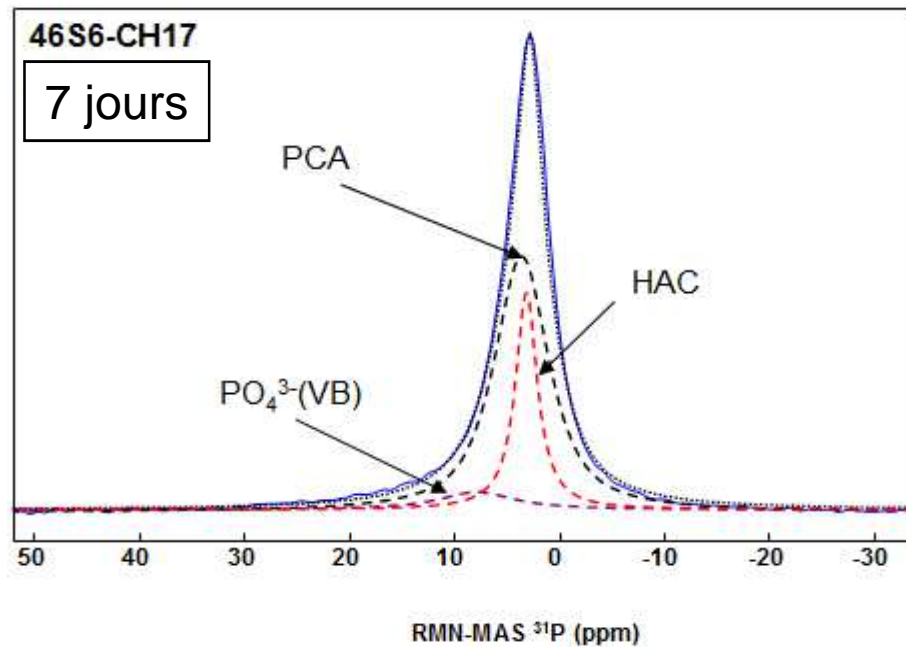
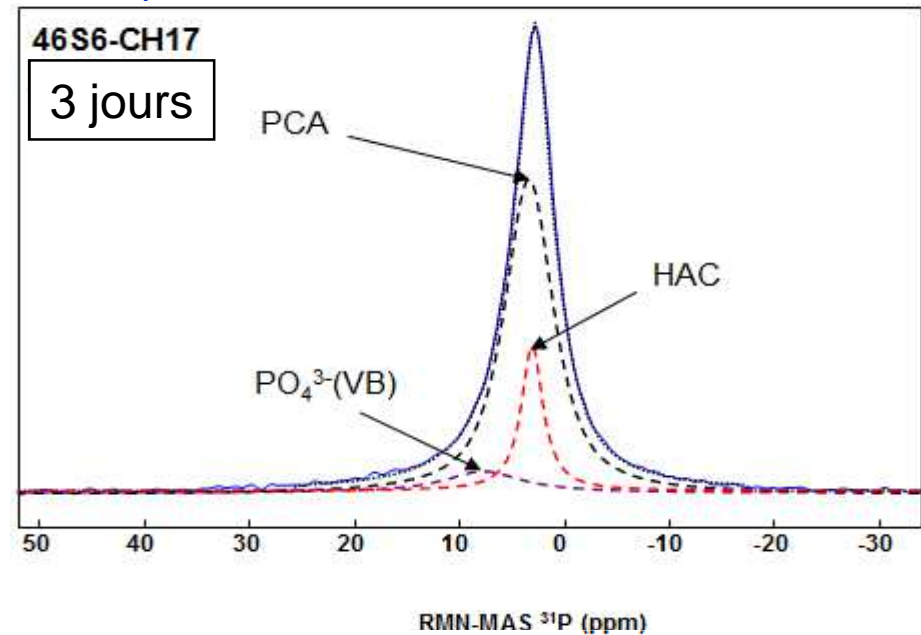
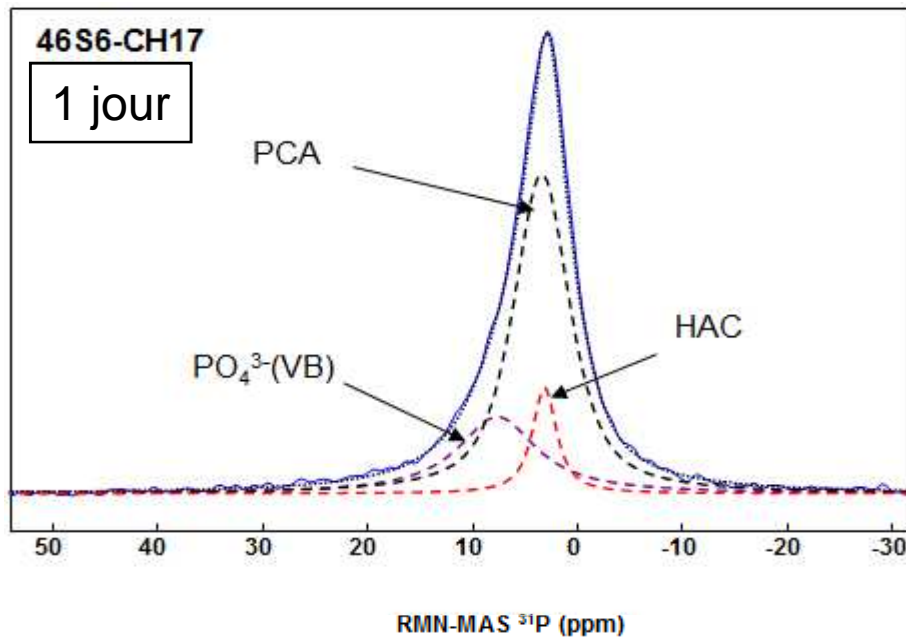


Après 15 jours:

- Disparition des espèces PO_4^{3-}
- Augmentation de la composante HAC

RMN-MAS ^{31}P (ppm)

Composite verre-chitosane après immersion: ^{31}P



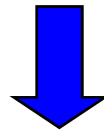
-Diminution des espèces $\text{PO}_4^{3-}(\text{VB})$ en fonction du temps

-Apparition de la composante HAC à 1j au lieu de 7 j pour le verre pur

- Augmentation de la composante HAC en fonction du temps d'immersion

Bioactivité du verre après immersion dans le liquide SBF

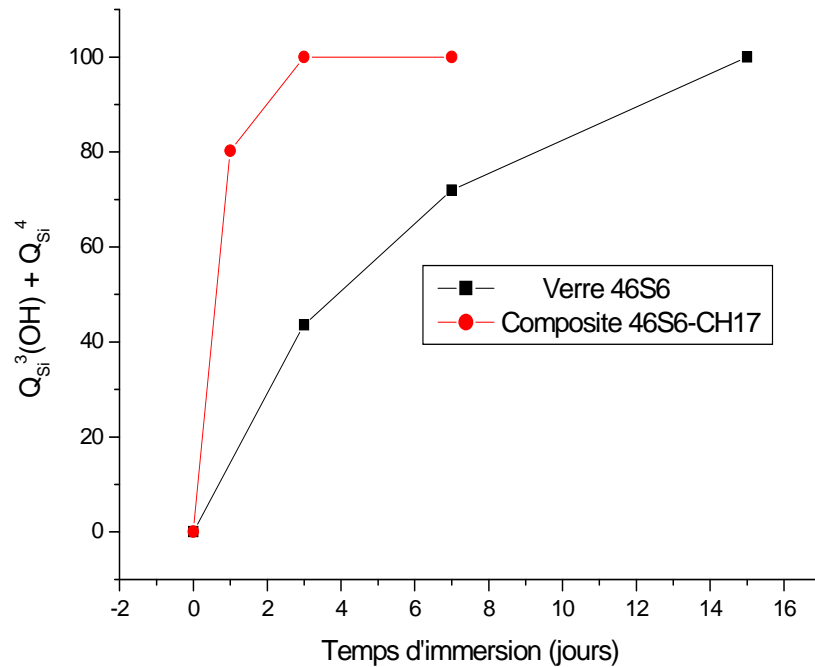
Formation d'un gel de silice à la surface du verre après immersion dans le liquide SBF.



4- Dépôt des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} à la surface du gel SiO_2 pour former un film de phosphate de calcium amorphe (PCA).

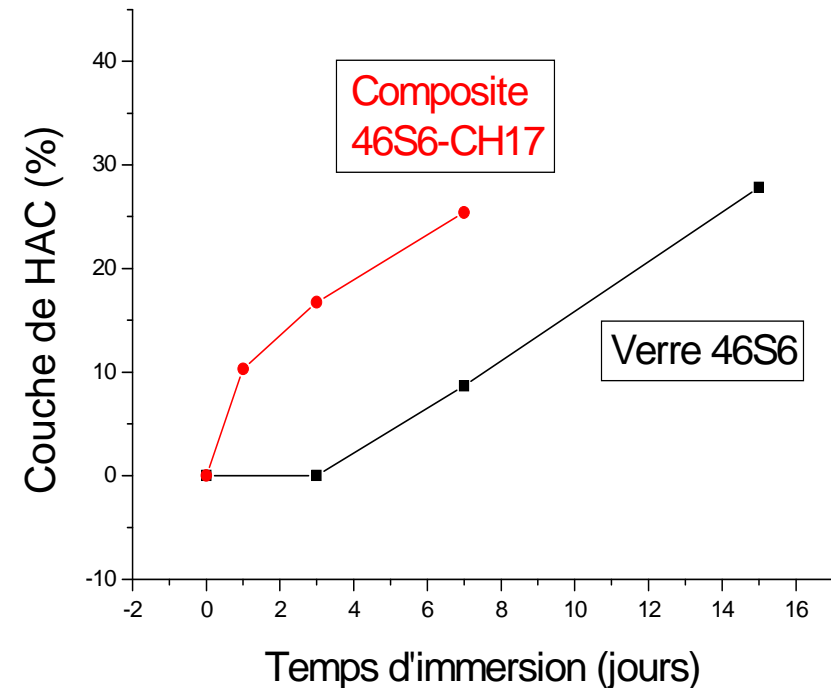
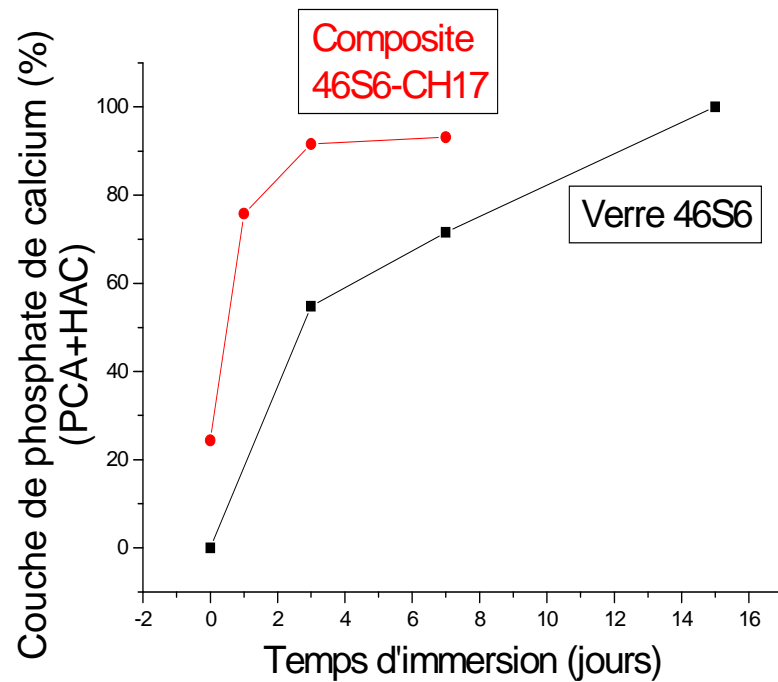
5- Evolution de la couche (PCA) en une couche cristallisée d'Hydroxyapatite carbonatée (HAC), proche de la phase minérale de l'os.

Comparaison $Q_{Si^3(OH)} + Q_{Si^4}$ (%) dans le verre pur 46S6 et dans le composite verre-chitosane



- Le composite verre-chitosane provoque une dissolution rapide de la matrice vitreuse par rapport au verre pur 46S6

Comparaison de la bioactivité du composite verre-chitosane et du verre pur 46S6: (PCA+HAC) et HAC (%)



Le composite verre-chitosane présente:

- Une formation rapide de: la couche de phosphate de calcium
la couche d'Hydroxyapatite carbonatée

à sa surface par rapport au verre pur après immersion dans le SBF

Mesure de la compression à la rupture:

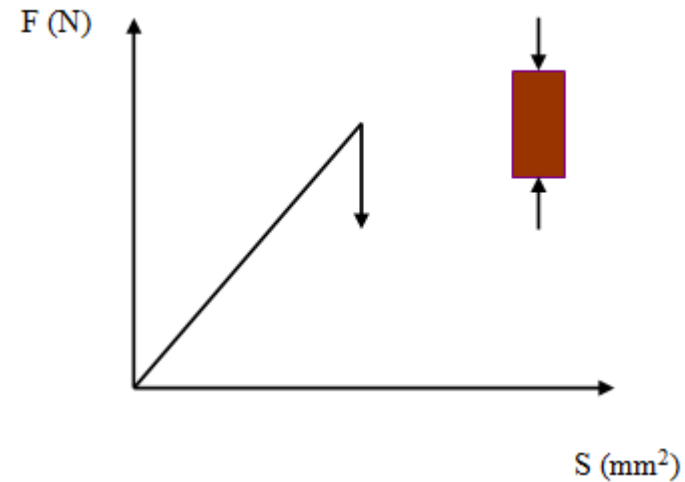
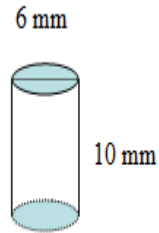
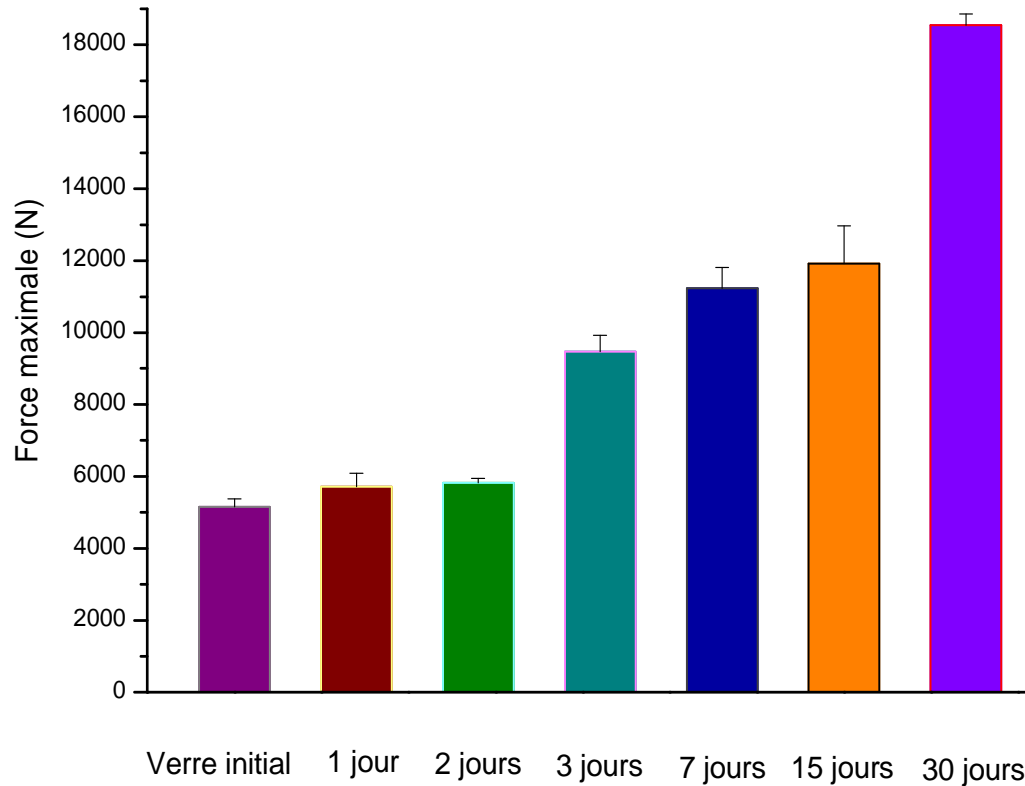


Schéma du test de compression

- Les cylindres en verre ont été immergés dans 15 ml de liquide SBF, à 37°C et sous agitation contrôlée (50 tours/min).
- Les délais d'immersion sont de 0, 1, 2, 3, 7, 15 et 30 jours.
- Les essais ont consisté à soumettre l'éprouvette à deux forces axiales jusqu'à la rupture.

Evaluation de la compression à la rupture du verre massif 46S6 en fonction du temps d'immersion dans le liquide SBF



- Augmentation de la compression à la rupture du verre en fonction du temps d'immersion

« Après immersion, de nouvelles couches se forment à la surface du verre »

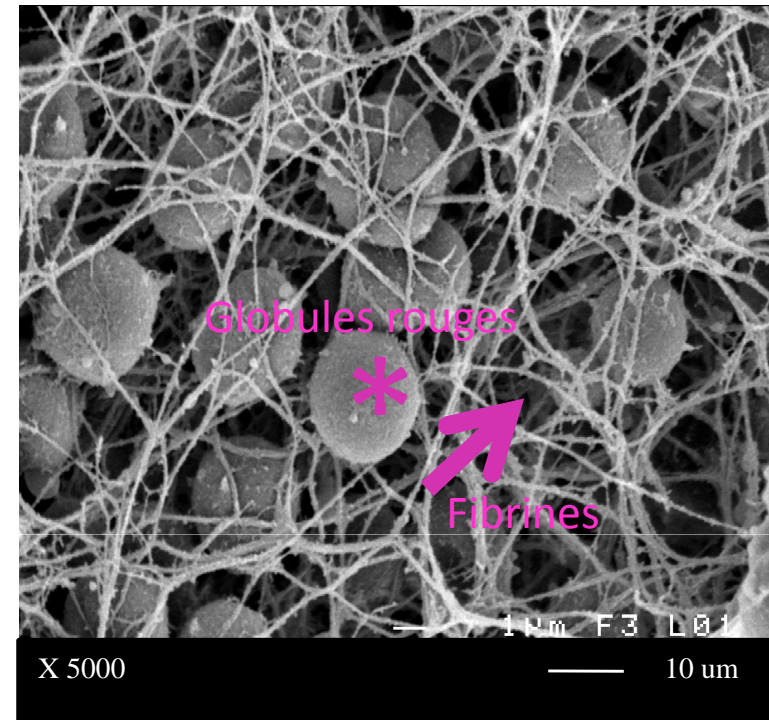
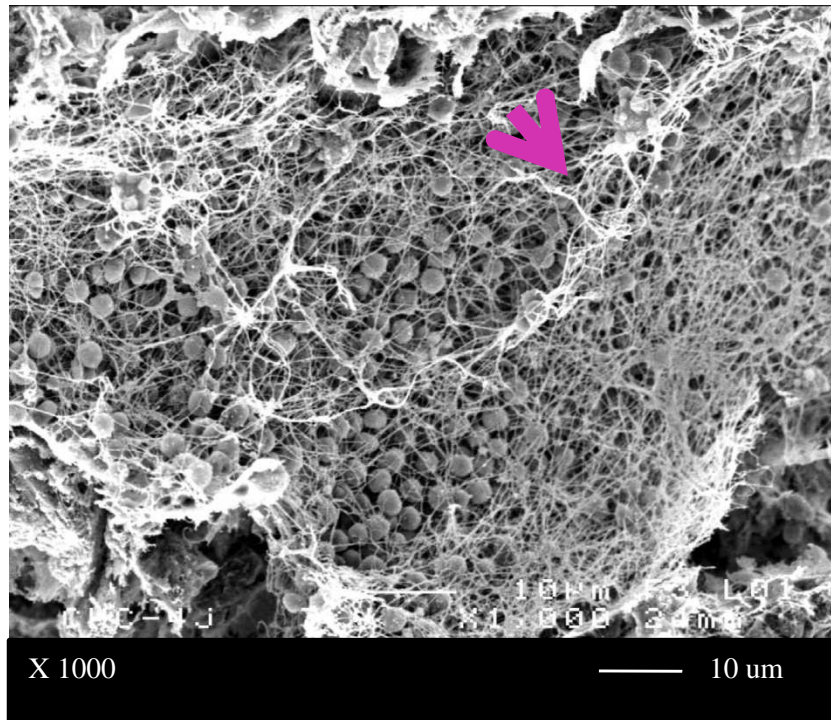


Ces couches diminuent la **fragilité** et augmentent la **résistance** du verre 46S6

Expérimentations *in vivo*

Modèle animal:	Rats Wistar: 3 mois, 300-385 g,
Biomatériaux implanté:	Verre bioactif pur et Verre associé au chitosane (17%)
Dimensions des implants:	Cylindres 3 mm de diamètre 4 mm d'épaisseur
Site d'implantation:	Condyle fémoral
Délais prélèvements:	4, 7, 15, 30 et 60 jours

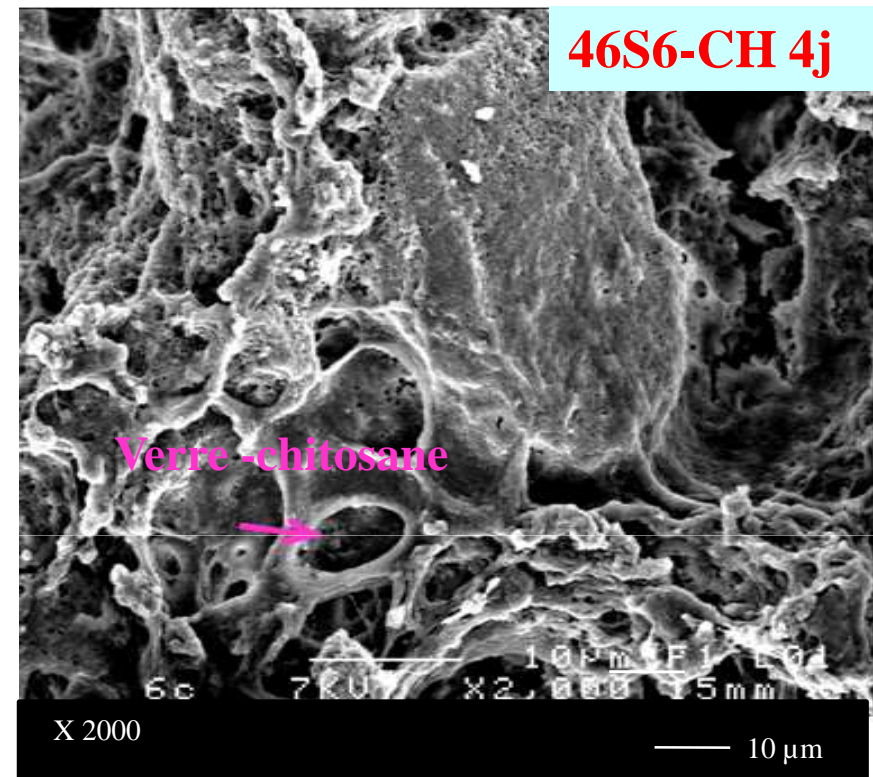
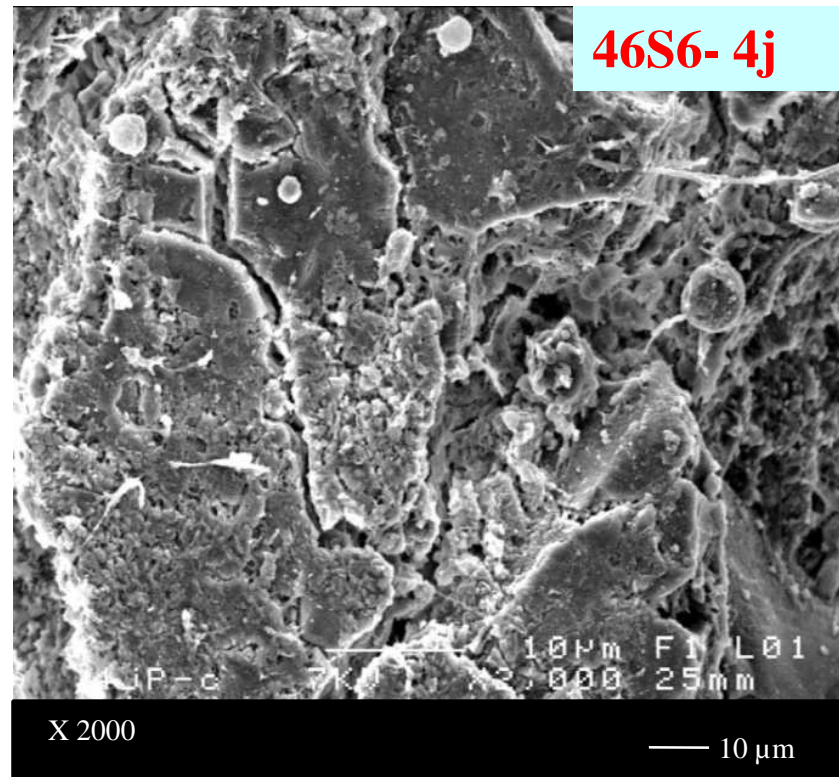
Effet du verre-chitosane sur l'hémostase et la cicatrisation osseuse



-Les fibrines piègent les globules rouges véhiculées par la neo vascularisation

-Enchâssées dans la matrice de fibrine, les cellules accélèrent la fermeture des brèches vasculaires et tissulaires.

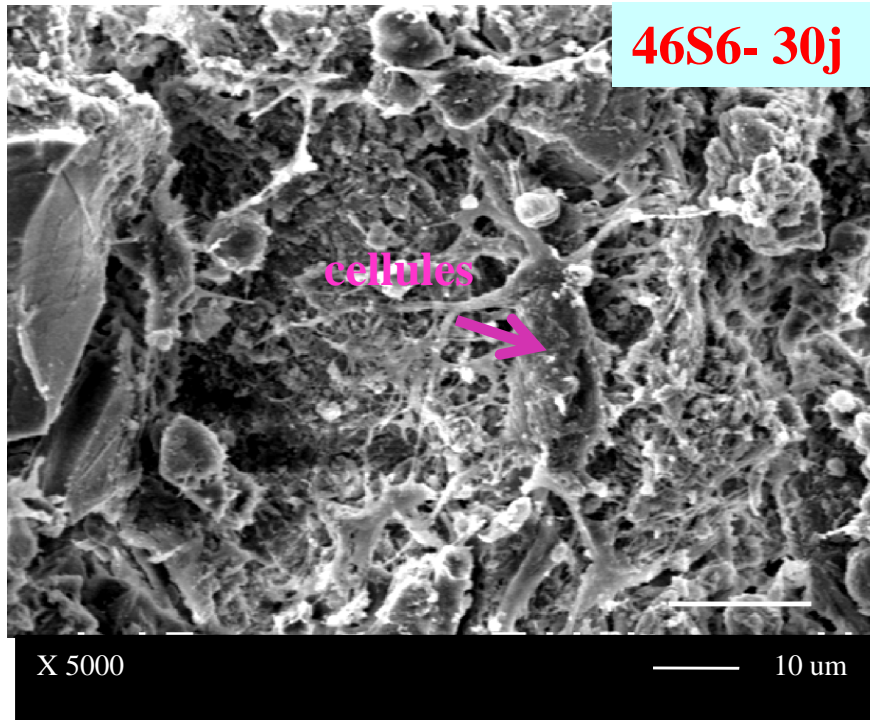
Envahissement cellulaire du verre pur et dopé par le chitosane



Verre pur : 4 j postopératoire

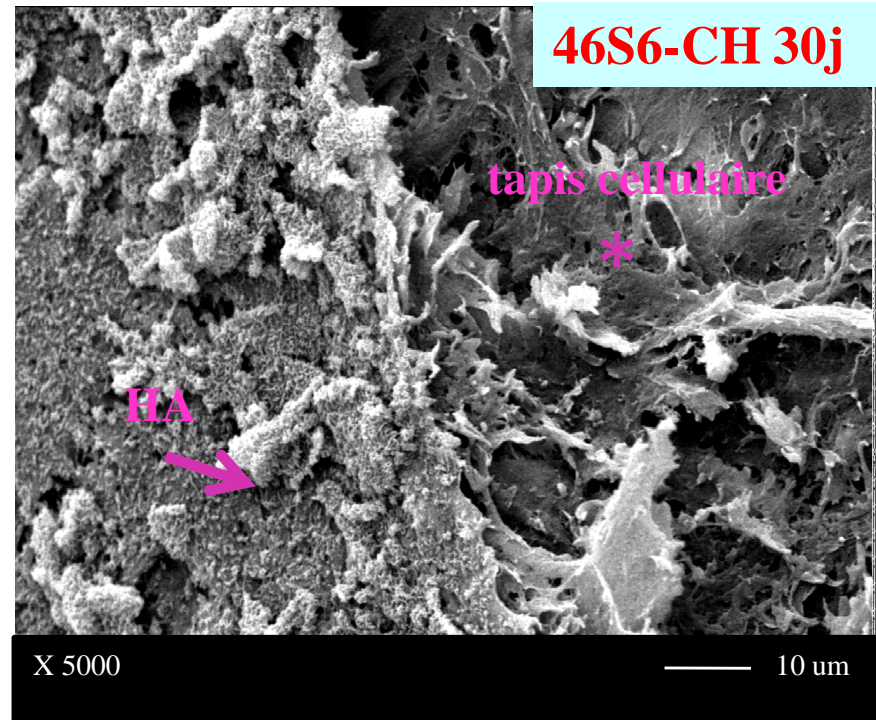
Verre-chitosane: 4j post-opératoire

Pas de présence de cellules



Verre pur 30 j post-opératoire:

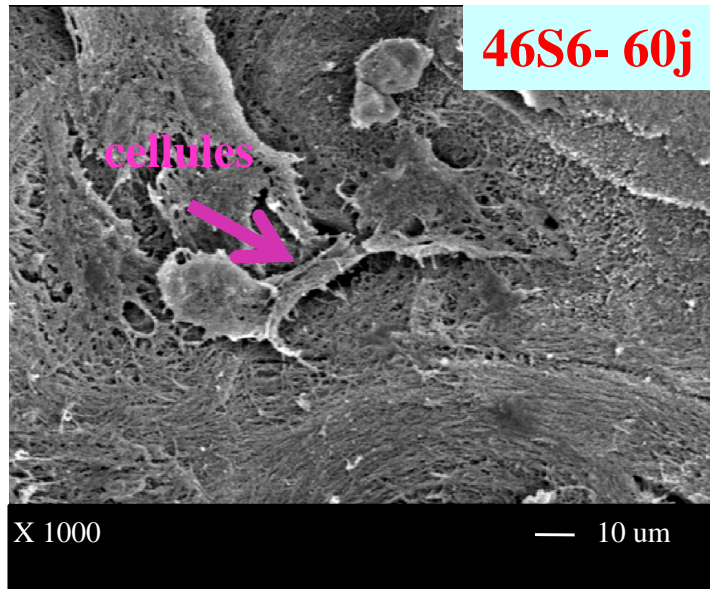
Faible densité cellulaire comparée à celle du verre - chitosane



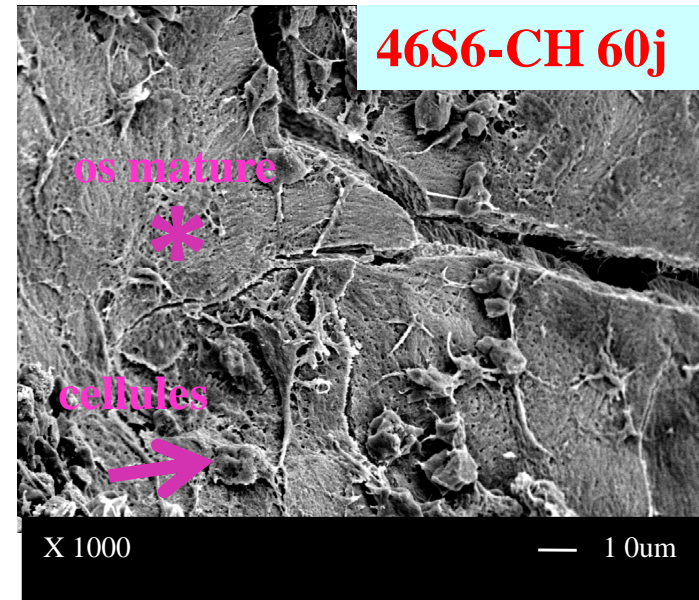
Verre-chitosane 30 j post-opératoire:

tapis cellulaire plus dense

Présence d'une couche d'apatite carbonatée dans le BG-CH:
site idéal pour l'accroche, la croissance cellulaire et la formation osseuse

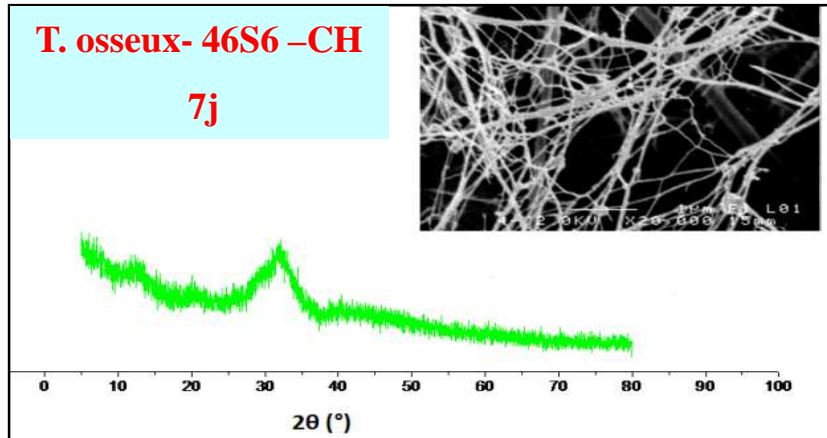


Verre pur : 60 j post-opératoire

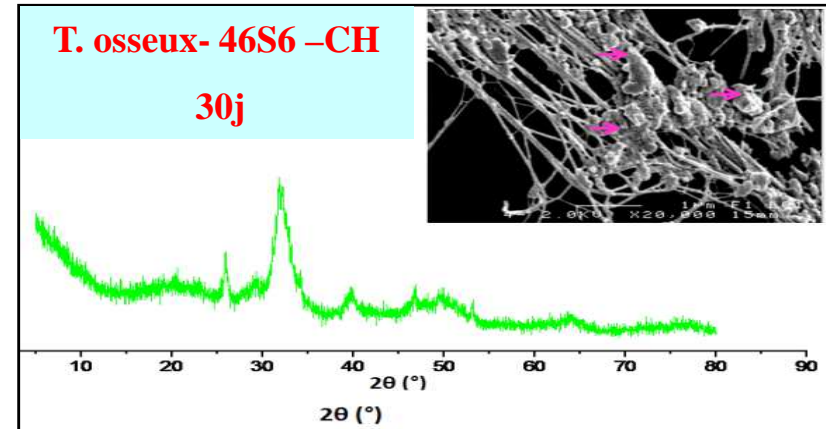


Verre-chitosane: 60 j post-opératoire

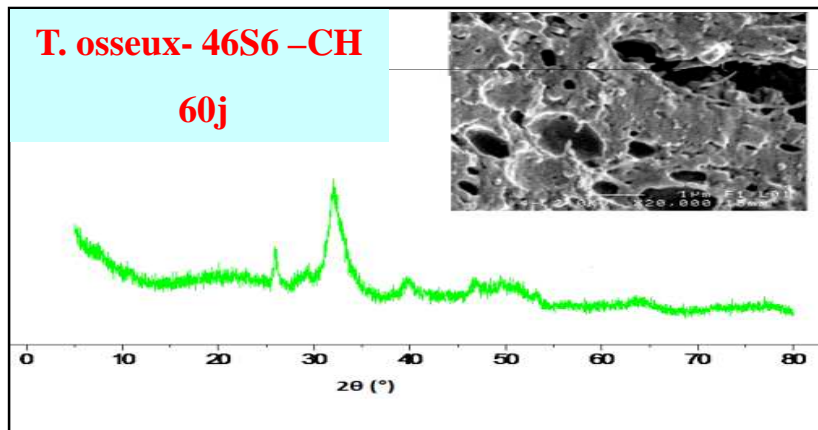
le verre -chitosane montre un aspect proche de l'os mature et une consolidation plus avancée que celle du verre pur



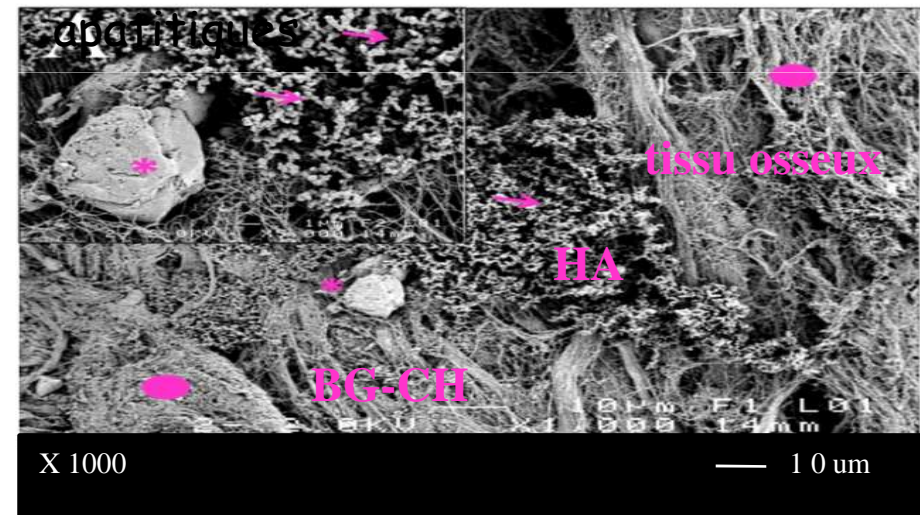
Présence de tissu fibreux



Présence de tissu fibreux
Germination des cristaux



Croissance de la couche apatitique



30j: Liaison HAP -Collagène
bibodégradation de BG-CH



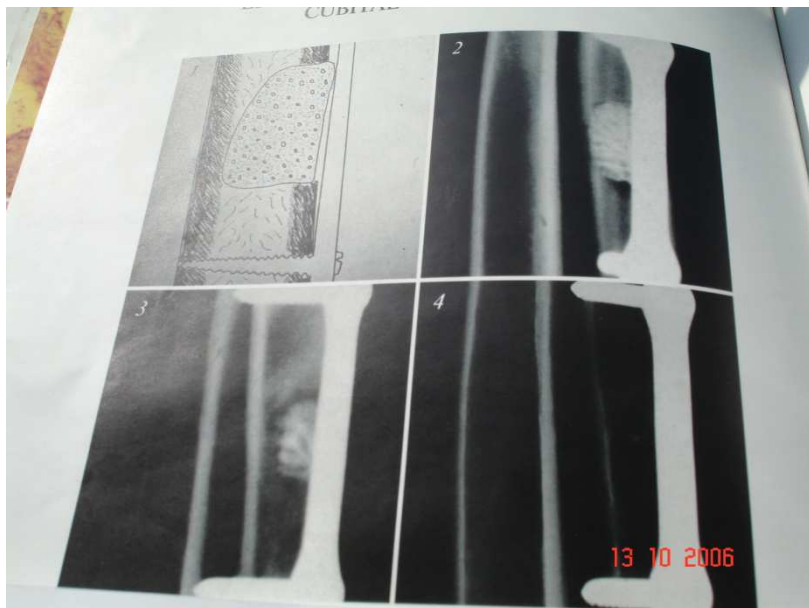
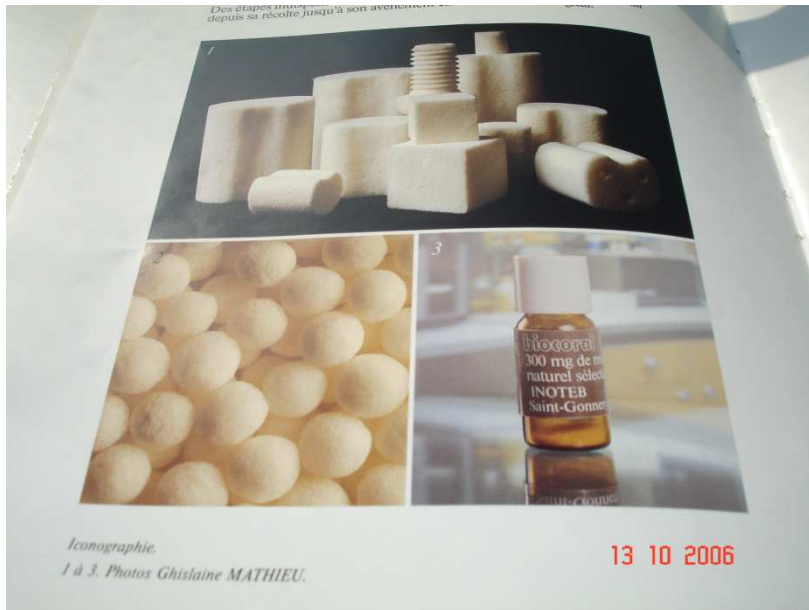
Clacium Phosphate:

Chirurgie orthopédique

Chirurgie maxillo-faciale

...





INOTEB

Besoins en Biomatériaux

- 25 milliard d'euros
taux de croissance annuel de 5 à 7%
- Un tiers de ce marché reviendrait à l'Europe
- Biomatériaux en site osseux:
8 milliards d'euros
taux de croissance annuel de 7%

Conclusion

* Evaluations *in vitro*:

Mise en évidence des effets du chitosane sur le comportement du verre:

- excellente capacité à former une couche d'apatite à sa surface.
- RMN du ^{29}Si et du ^{31}P : Effets du chitosane sur la dissolution du réseau vitreux et sur la bioactivité du verre 46S6
- Augmentation de la compression à la rupture en fonction du temps

* Evaluations *in vivo*:

- améliore la propriété hémostatique.
- facilite les processus de réparation osseuse
- favorise l'invasion par les cellules osseuses ostéoformatrices.
- stimule la germination de cristaux apatitiques

Remerciements

C. Roiland, B. Bureau, O. Merdrignac-Conanec, (V et C)

J.C. Sangleboeuf, (LARMAUR)

P. Pellen, (UFR Odontologie)

J. Lelanic (CMEBA)