Reçu le 04 septembre 2022 ; accepté le 26 novembre 2022

RÉDUCTION DE LA TAILLE DES DÉFAUTS OSSEUX CRITIQUES DE LA CALVARIA DE RATS COMBLÉS AU « *LOKPO* »

REDUCTION OF THE SIZE OF CRITICAL BONE DEFECTS IN THE CALVARIA OF FULL RATS AT "LOKPO"

TRAORÉ Z [1,2], KOUAMÉ P[1], ZUNON-KIPRÉ Y[3], AMANTCHI D[1], KOUYATÉ V [1,2,].

1- Département de pathologies-thérapeutiques, radiologie, anesthésiologie et réanimation de l'UFR d'odontostomatologie de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire).

2- Laboratoire de Biomorphologie, Pathologies Oro-faciales et Santé bucco-dentaire de de l'UFR d'odontostomatologie de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire).

3- Laboratoire d'Anatomie Normale et Chirurgie Expérimentale et Biomécanique de l'UFR des sciences médicales d'Abidjan de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire).

Correspondance : Docteur TRAORÉ Zié

Email : traoreziea@gmail.com.

ORCID :0000-0003-2237-9026.

RÉSUMÉ

Introduction : Les défauts osseux de taille critique sont des pertes de substances osseuses importantes et incapables d'initier la réparation seule sans apport extérieure. Ces défauts peuvent contrarier la mise en œuvre de techniques de réhabilitation de l'appareil manducateur et un comblement de ces défauts par un matériau ostéoformateur local riche en silice et en alumine, le « *Lokpo* », peut être très bénéfique en raison de ses propriétés antibactériennes, hémostatiques et anti-inflammatoires. Aussi, avons-nous recherché son potentiel de régénération osseuse par la présente étude.

Matériel et méthode : Création de défauts osseux de taille critique au niveau de la calvaria de 12 rats *Sprague-Dawley* divisé en deux groupes de six. Les défauts osseux de taille critique du premier groupe ont été comblés avec le « *Lokpo* », tandis que ceux du second groupe ont été laissés vides. Une comparaison des superficies des défauts osseux a été effectuée grâce à des radio-visio-graphies (RVG) couplées au logiciel *Image J®* permettant de mesurer la superficie des défauts à 30 et 90 jours de suivi.

Résultats : A J90, la superficie initiale des défauts comblés avec le *"Lopko"* est passée à une moyenne de 2,50 ± 0,627 mm² tandis que celle laissée vide est passée à 43,16 ± 1,482 mm². Ces résultats mettent en évidence une réduction significative de la superficie moyenne de défauts osseux de taille critiques comblés au « *lokpo* » à la RVG.

Conclusion : Ces résultats constituent une présomption de néoformation osseuse à confirmer par l'histologie.

Mots-clés : Lokpo, défauts de taille critique, RVG, Rat sprague-Dawley.

ABSTRACT

Introduction: *Critical size bone defects are large losses of bone substance and unable to initiate repair alone without external input. These defects can hinder the implementation of rehabilitation techniques of the manducatory apparatus and a filling of these defects by a local osteoforming material rich in silica and alumina, "Lokpo", can be very beneficial because of its antibacterial, haemostatic, and anti-inflammatory properties. Therefore, we investigated its potential for bone regeneration in the present study.*

Material and method: *Creation of critical size bone defects in the calvaria of 12 Sprague-Dawley rats divided into two groups of six. The critical size bone defects of the first group were filled with "Lokpo", while those of the second group were left empty. A comparison of the surface areas of the bone defects was performed using radio-visual graphics (RVG) coupled with Image J® software to measure the surface areas of the defects at 30 and 90 days of follow-up.*

Results: *At D90, the initial surface area of the defects filled with "Lopko" increased to an average of 2.50 ± 0.627 mm² while that left empty increased to 43.16 ± 1.482 mm². These results demonstrate a significant reduction in the mean area of critical bone defects filled with "lokpo" at RVG.*

Conclusion: *These results constitute a presumption of bone neoformation to be confirmed by histology.*

Key words: ***Lokpo, critical size defects, RVG, Sprague-Dawley rat.***

© EDUCI 2022

INTRODUCTION

Les défauts osseux de la sphère orofaciale sont d'origine congénitale ou acquises consécutifs à un traumatisme, une infection ou une résection chirurgicale. Leur prise en charge est basée sur l'apport des greffes osseuses (autogreffes ou allogreffes). Cependant, celles-ci sont soumises à des contraintes de quantité d'os disponible, d'allongement du temps de convalescence et de transmission d'agents pathogènes[1] . Dans le but d'y pallier, l'ingénierie tissulaire osseuse constitue une approche prometteuse pour la recherche de nouveaux biomatériaux synthétiques[2]. Elle utilise en expérimentation un modèle de défaut osseux critique de la calvaria de rat qui ne peut se réparer sans apport de matériaux de substitution osseuse [3]. Parmi ces matériaux, les bioverres ont montré leur efficacité dans la régénération des défauts osseux de taille critique grâce à leur richesse en silice [4]. Un matériau à base de kaolinite extrait de roches sédimentaires de la commune de Bingerville (Côte d'Ivoire) dont le nom vernaculaire est le « Lokpo » a fait l'objet de plusieurs études [5,6]. Sa richesse en silice et en alumine, fait de lui un candidat pour des applications cliniques de la réparation osseuse[7,8]. A ce jour, aucune étude n'a fait l'objet de l'utilisation du « Lokpo » dans cette perspective. Ainsi, cette étude se propose de comparer les variations de superficies de défauts osseux de tailles critiques de la calvaria de rats comblés avec le « Lokpo ».

1. METHODES

1.1. TYPE ET CADRE DE L'ÉTUDE

Ce travail est une étude expérimentale préclinique comparative sur modèle animal.

Trois laboratoires de l'université Félix Houphouët-Boigny ont servi de cadre de réalisation. Il s'agit du laboratoire de Biomorphologie, Pathologies Oro-faciales et Santé bucco-dentaire de l'UFR-OS, du laboratoire d'Anatomie Normale et Chirurgie Expérimentale et Biomécanique de l'UFR des sciences médicales d'Abidjan et du laboratoire de Biologie et Santé de l'UFR de Biosciences.

1.2. POPULATION D'ÉTUDE

La population de cette étude est constituée de rats de souche Sprague-Dawley (SD) mâles, en bonne santé apparente. Ont été inclus, des rats mâles, âgés de 18 mois avec un poids moyen de 250 g ± 5. Les motifs d'exclusion ont été la mort du rat avant la détermination des critères de jugements, l'apparition de complications infectieuses non maitrisables et la perte de plus de 20% de la masse corporelle initiale de l'animal.

1.3. MATÉRIAU EXPÉRIMENTAL *« LOKPO »*

Le « Lokpo » est une argile comestible retrouvée dans plusieurs localités de la Côte d'Ivoire. Dans le cadre de cette étude, il a été extrait du bassin sédimentaire de la carrière de Bingerville. Ce matériau a été fourni par le Laboratoire de Chimie des Matériaux Inorganiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny. Il est principalement constitué de silice et d'alumine.

1.4. MATÉRIELS

1.4.1. Matériels de chirurgie pour la création des défauts osseux

- Des lames de bistouri n°11.
- Des décolleurs de Molt.
- Un trépan de 8 mm de diamètre.
- Un micromoteur, contre angle.
- Une spatule de ward, curette, pinces hémostatiques, porte-aiguille.
- Des fils de suture résorbables (0,5 et 0,4).
- Un tapis chauffant électrique.

1.4.2. Matériel de radiographie numérique

Il s'agissait d'une radio-visiographie (RVG), constitué de :

- une unité centrale et un moniteur ;
- un tube de rayons X ;
- un capteur de rayon X connecté à l'unité centrale.

1.5. DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

Cette étude s'est déroulée en différentes étapes successives.

1.5.1. Préparation de la poudre de *Lokpo* et de l'acclimatation des rats

Le *lokpo* a été préalablement broyé dans un mortier, puis tamisé afin d'obtenir une poudre. Cette poudre a été stérilisée à 120°C à l'autoclave pendant 20 minutes. Les rats livrés ont été acclimatés et nourris ad-libitum avec des granulés pendant un mois avant le début de la manipulation.

1.5.2. Etape chirurgicale et de détermination des variations de superficie des défauts osseux

Après l'étape de l'acclimatation, une anesthésie intra-péritonéale de Kétamine (40 mg/kg) et de Xylazine (10 mg/kg) a été effectuée. Ensuite, une chirurgie de création de défaut osseux au niveau de la calvaria des rats (entre les deux os pariétaux) a été réalisée (Figure 1). Deux groupes de rats ont été par la suite constitués de façon aléatoire. Les défauts osseux du premier groupe ont été comblés avec le « Lokpo », tandis que ceux du second groupe ont été laissé vides. Après un suivi de 30 jours, une moitié des rats du premier et du second groupe a été sacrifié. L'autre moitié du premier groupe et du second groupe a été sacrifié au 90ème jour de suivi. A chaque étape, l'acquisition ex-vivo des RVG (RVG-model CS2100, Carestream) s'est faite à 60kV avec une intensité de 7 mA. Le temps d'exposition aux rayons a été de 0,2 s par image radiographique. Ces RVG axées sur les défauts osseux ont été effectuées après retrait de l'étage inférieur mobile du crâne (mandibule). Un logiciel de traitement de ces images radiographiques appelé « Image J® » (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.) a permis de déterminer les variations de superficie des défauts osseux initialement crées. Ce logiciel a été préalablement calibré sur la base des 8mm de diamètre du défaut considéré comme l'étalon. Ce logiciel donne automatiquement la superficie du défaut osseux. La variation en pourcentage de la superficie du défaut osseux de J0 à J30 d'une part et de J0 à J90 est obtenu grâce à la formule:

$$\frac{\text{Superficie initiale du défaut osseux de taille critique} - \text{Superficie initiale du défaut osseux de taille critique à J30 ou J90}}{\text{Superficie initiale du défaut osseux de taille critique}} \times 100$$

Création de défaut osseux au niveau de la calvaria du rat | Comblement du défaut osseux au « *Lokpo* » | Suture de la plaie chirurgicale

Figure n°1 *: Création du défaut et implantation du lokpo dans la calvaria de rat*

1.6. CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES

Cette étude expérimentale chez le rat a été réalisée en accord avec les normes internationales relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Directive 2010/63/UE modifiée par le règlement (UE) 2019/1010).

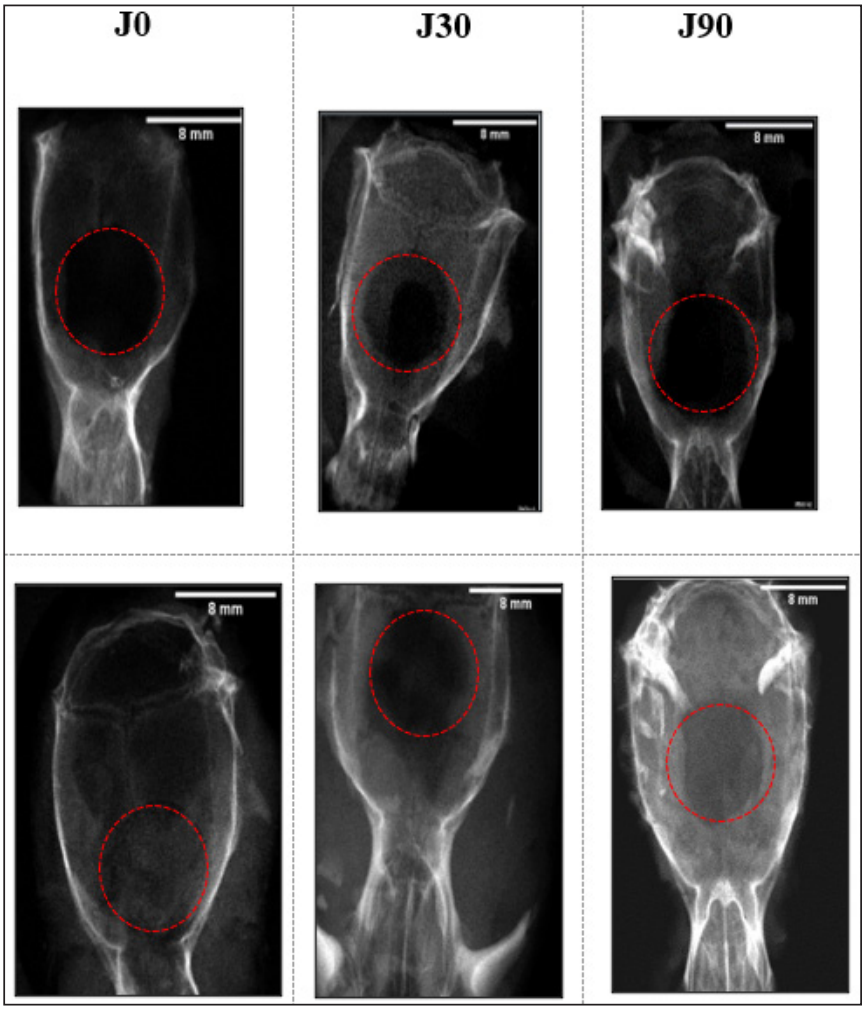
1.7. ANALYSES STATISTIQUES

Le logiciel statistique (R4.2.0) a servi à traiter et mener l'analyse statistique ainsi que le tracé graphique des résultats. Les valeurs ont été données sous la forme de moyennes suivie d'un écart-type. La comparaison des moyennes des différents groupes à J30 et à J90 a été effectuée par le test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

2. RÉSULTATS

Initialement 12 rats ont été inclus dans l'étude. Deux rats sont morts pendant l'expérimentation et ont été remplacés. L'analyse des données a donc concerné 12 rats.

 © EDUCI 2022



Défaut osseux de la calvaria de rat vides (Témoins négatifs)

Défaut osseux de la calvaria de rat comblés au «lokpo»

***Figure 2** : Aspects visuels des images radiographiques de la calvaria de rat de (J0, J30 et J90*

***Tableau I** : Mensurations des superficies des défauts osseux de la calvaria*

Superficie moyenne des défauts osseux de la calvaria en mm²	J0	J30	J90
Défauts osseux vides (Témoins négatifs)	50,13 mm²	25,5 ± 1,536 mm²	43,16± 1,482 mm²
Défauts osseux comblés avec le *lokpo*	50,13 mm²	6,849 ± 0,431 mm²	2,50 ± 0,627 mm²

3. DISCUSSION

Dans cette étude les rats sprague-Dawley ont été utilisés, Ils constituent des modèles les plus utilisés dans les études précliniques [9] comme le souligne Cao *et al.* [10]. Le choix du site d'implantation du matériau (calvaria) a été motivé par son accessibilité, sa faible vascularisation ainsi que par sa faible quantité de cellules souches [11]. Aussi, ce site permet de réaliser des défauts standardisés, reproductibles et facile à évaluer par la radiologie et l'histologie [12]. Le matériau expérimental *« lokpo »* caractérisé par le laboratoire de chimie des matériaux inorganiques de l'UFR de biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny a une composition minéralogique proche de celle des bioverres 45S5[6]. Ces biomatériaux riches en silice qui stimule la production de collagène gage de la régénération osseuse, constituent à ce jour une référence en bio-ingénierie [12] . Par ailleurs, les travaux de Kouakou *et al.* ont mis en évidence des propriétés antibactérienne, anti-inflammatoire et hémostatique du *« lokpo »*. Ce constat a été noté dans les études de Salehi en 2020. Ces travaux démontrent que la kaolinite

(silice et alumine) constitue un échafaudage pour la cicatrisation des plaies et possède une l'activité antibactérienne[14]. Ces différents éléments ont motivé le choix de ce matériau [5,6]. La visualisation de défauts osseux de tailles critiques comblés avec le *lokpo* à l'aide de la RVG est aisée et reproductible. Cette technique a également été utilisée par Jolly *et al.* en 2021 [15] pour mettre en évidence de radio-opacité dans un défaut osseux de calvaria de rats. L'analyse de la RVG ex-vivo montre des variations de superficies de radio-opacité de J0 à J90.

A J30, la superficie moyenne des défauts osseux de taille critiques comblés avec le *"Lopko"* est passée de 50,13 mm² à 6,849 ± 0,431 mm² tandis que celle laissée vide est passée de 50,13 mm² à 25,5 ± 1,536 mm². Une analyse comparative à montrer que la réduction de la superficie moyenne de ces défauts osseux est significativement plus importante (p-value= 1,1784899.10-5 <0,05) au niveau des défauts osseux comblés avec le *"Lopko"* par rapport aux défauts laissés vides.

A J90, la superficie moyenne des défauts osseux de taille critiques comblés avec le "Lopko" est passée de 50,13 mm² à 2,50 ± 0,627 mm² tandis que celle laissée vide est passée de 50,13 mm² à 43,16 ± 1,482 mm². La variation de la réduction de la superficie moyenne des défauts osseux comblés avec le *'' Lokpo''* est significativement plus importante (p-value = 1,1729875.10-7 <0,05) au niveau des défauts osseux comblés avec le *"Lopko"* par rapport aux défauts laissés vides. L'analyse comparative de J30 et J90 a montré que la superficie de la radio-opacité dans les défauts osseux de taille critique comblés au *lokpo* à J90 est significativement supérieure (p-value = 0.00065306573 <0,05) à celle observée à J30 contrairement à la superficie de la radio-opacité dans les défauts osseux de taille critique vides (p-value = 0.99993 > 0,05).

La superficie de la radio-opacité observée dans les défauts osseux de tailles critiques vides à J30 et à J90 pourrait s'expliquer par une tentative de réparation osseuse initiée par le périoste qui borde le défaut selon Yang *et al.*[16].

L'analyse de la RVG *ex-vivo* nous a montré des superficies de radio-opacité significativement importantes dans les défauts osseux de taille critique de la calvaria comblé au *lokpo*. Cette augmentation des superficies de radio-opacité pourrait d'une part s'expliquer par la présence de *Lopko* et d'autre part par l'existence de périoste qui borde le défaut. En effet, la présence de Lopko riche en silice et alumine stimule la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers la voie ostéoblastique [16]. Cette activité favorise la néoformation osseuse dans le défaut osseux. La présente étude est en phase avec celle de Suryaningtyas *et al.* qui ont induit une différenciation des précurseurs ostéoblastiques par injection de la kaolinite chez le rat Sprague-Dawley [17]. Aussi, Jolly *et al.* ont -ils utilisé le même modèle animal avec un défaut osseux de taille critique réalisé dans la calvaria. Le nanocomposite (BCHD) a servi de matériau de comblement et après un suivi de 60 jours, les animaux ont été sacrifiés puis la RVG a été réalisée. En outre, ils ont associé l'histologie déminéralisée pour démontrer que le matériau de comblement utilisé, a favorisé l'ostéorégénération [15].

CONCLUSION

Le *lokpo* utilisé pour le comblement des défauts osseux de taille critique dans cette étude a montré une réduction significative de la superficie moyenne de ces défauts osseux. Ce résultat constitue une présomption d'ostéorégénération qui doit être confirmé par des techniques d'investigation histologiques, de biologie moléculaire et des techniques de microscanner.

RÉFÉRENCES

1. LIU M, LV Y. Reconstructing Bone with Natural Bone Graft: A Review of In Vivo Studies in Bone Defect Animal Model. *Nanomaterials*. déc 2018;8(12):999.
2. MOHAN S, KARUNANITHI P, RAMAN MURALI M, ANWAR AYOB K, MEGALA J, GENASAN K, et al. Potential Use of 3D CORAGRAF-Loaded PDGF-BB in PLGA Microsphere Seeded Mesenchymal Stromal Cells in Enhancing the Repair of Calvaria Critical-Size Bone Defect in Rat Model. Marine Drugs. sept 2022;20(9):561.
3. LIU B, LI J, LEI X, CHENG P, SONG Y, GAO Y, et al. 3D-bioprinted functional and biomimetic hydrogel scaffolds incorporated with nanosilicates to promote bone healing in rat calvarial defect model. *Materials Science and Engineering*: C. 1 juill 2020;112:110905.
4. JORDANA F, LE VISAGE C, WEISS P. [Bone substitutes]. *Med Sci* (Paris). janv 2017;33(1):60-5.
5. KOUAKOU LPMS, ANDJI-YAPI YJ, COULIBALY-KALPY J. Argiles utilisées dans la curation de diverses affections en Côte d'Ivoire : étude de l'effet antibactérien. *Revivoirscitechnol.* 2014;24:84-92.

 © EDUCI 2022

6. COULIBALY V, SEI J, KOFFI LK, OYETOLA S, JDID EA, THOMAS F. Mineralogical and Chemical Characteristics of Clays Consumed in the District of Abidjan (CÔte D'Ivoire). *MSA*. 2014;05(14):1048-59.

7. MÜLLER AS, JANJIĆ K, SHOKOOHI-TABRIZI H, OBEROI G, MORITZ A, AGIS H. The response of periodontal cells to kaolinite. *Clin Oral Investig*. mars 2020;24(3):1205-15.

8. MASSARO M, NOTO R, RIELA S. Past, Present and Future Perspectives on Halloysite Clay Minerals. *Molecules*. 21 oct 2020;25(20):E4863.

9. CHO JH, CHO DC, YU SH, JEON YH, SUNG JK, KIM KT. Effect of dietary calcium on spinal bone fusion in an ovariectomized rat model. *J Korean Neurosurg Soc*. oct 2012;52(4):281-7.

10. CAO FY, FAN JX, LONG Y, ZENG X, ZHANG XZ. A smart fluorescence nanoprobe for the detection of cellular alkaline phosphatase activity and early osteogenic differentiation. *Nanomedicine. juill* 2016;12(5):1313-22.

11. CALIAPEROUMAL G, SOUYET M, BENSIDHOUM M, PETITE H, ANAGNOSTOU F. Type 2 diabetes impairs angiogenesis and osteogenesis in calvarial defects: MicroCT study in ZDF rats. Bone. 1 juill 2018;112:161-72.

12. FERNÁNDEZ MP, WITTE F, TOZZI G. Applications of X-ray computed tomography for the evaluation of biomaterial-mediated bone regeneration in critical-sized defects. *J Microsc. mars* 2020;277(3):179-96.

13. ZARE JALISE S, BAHEIRAEI N, BAGHERI F. The effects of strontium incorporation on a novel gelatin/bioactive glass bone graft: In vitro and in vivo characterization. *Ceramics International*. 15 août 2018;44(12):14217-27.

14. SALEHI M, FARZAMFAR S, EHTERAMI A, PAKNEJAD Z, BASTAMI F, SHIRIAN S, et al. Kaolin-loaded chitosan/polyvinyl alcohol electrospun scaffold as a wound dressing material: in vitro and in vivo studies. *J Wound Care*. 2 mai 2020;29(5):270-80.

15. JOLLY R, FURKAN M, KHAN AA, AHMED SS, ALAM S, FAROOQI MA, et al. Synthesis and characterization of β-cyclodextrin/carboxymethyl chitosan/hydroxyapatite fused with date seed extract nanocomposite scaffolds for regenerative bone tissue engineering. *Mater Adv*. 2021;2(17):5723-36.

16. YANG Z, YANG Z, DING L, ZHANG P, LIU C, CHEN D, et al. Self-Adhesive Hydrogel Biomimetic Periosteum to Promote Critical-Size Bone Defect Repair via Synergistic Osteogenesis and Angiogenesis. *ACS Appl Mater Interfaces*. 17 août 2022;14(32):36395-410.

17. SURYANINGTYAS W, PARENRENGI MA, BAJAMAL AH, RANTAM FA. Lipid Peroxidation Induces Reactive Astrogliosis by Activating WNT/β-Catenin Pathway in Hydrocephalus. *Malays J Med Sci*. mai 2020;27(3):34-42.