



HAL
open science

Les substituts du tissu osseux

Jacques Fages, Patrick Frayssinet

► **To cite this version:**

Jacques Fages, Patrick Frayssinet. Les substituts du tissu osseux. SEMINAIRE TIPE BIOMATERIAUX, Oct 1996, Albi, France. hal-01826374

HAL Id: hal-01826374

<https://imt-mines-albi.hal.science/hal-01826374v1>

Submitted on 20 Aug 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LES SUBSTITUTS DU TISSU OSSEUX

Pr. Jacques FAGES, Ecole des Mines, 81013 Albi cedex 09

Dr. Patrick FRAYSSINET, Bioland, 31100 Toulouse

Les matériaux de substitution du tissu osseux sont des matériaux qui sont destinés à guider ou bien favoriser la régénération osseuse puis à être intégrés dans le tissu osseux et subir les mêmes processus de remodelage que ce dernier.

Cette action du matériau sur le tissu se fait à travers ses constituants principaux: les cellules osseuses responsables de la morphogenèse, en particulier, les ostéoblastes (responsables de la synthèse de la matrice osseuse), les ostéoclastes (responsables de la résorption osseuse) et les cellules du tissu conjonctif.

L'action du matériau sur ces différentes cellules s'intègre dans un schéma interrelationnel, entre ces cellules, complexe et imparfaitement connu. Néanmoins, la régénération osseuse et l'intégration du matériau nécessitent la présence dans le site d'implantation d'ostéoblastes actifs synthétisant une matrice extracellulaire osseuse formant d'abord un tissu osseux immature qui par le jeu du remodelage osseux va ensuite s'organiser en tissu osseux mature.

La finalité de l'action des biomatériaux substitutifs du tissu osseux est d'obtenir ces cellules dans un site ou par définition elles ne sont pas. Nous détaillerons successivement les caractéristiques des principaux protagonistes intervenant dans la biologie de l'intégration des substituts osseux: les cellules osseuses et les matériaux constitutifs des substituts.

Origine des cellules dans la cicatrisation osseuse.

Les cellules osseuses, cartilagineuses ou fibroblastiques ont la même origine. Elles sont issues d'une même cellule souche.

On a, depuis longtemps, constaté chez l'homme que divers tissus au contact de l'os, en particulier le périoste (membrane qui entoure les os) et la moelle osseuse, lorsqu'ils sont lésés, cicatrisent en donnant des ostéoblastes actifs à partir de cellules quiescentes d'allure fibroblastique. Les travaux de Friedenstein¹ ont montré que des cellules médullaires de rongeurs mises en culture pouvaient *in vitro* exprimer des caractéristiques ostéoblastiques. Ces lignées peuvent former des clones ayant des caractéristiques différentes, certains d'entre eux seulement ayant des caractéristiques ostéoblastiques². Divers facteurs orientent leur différenciation vers un phénotype ou un autre : c'est la multipotence. Il semble que les cellules capables de prolifération pour donner des clones de cellules à caractères ostéoblastiques soient en très petit nombre dans les tissus osseux et en particulier dans le tissu médullaire³.

Ces caractéristiques sont celles de cellules souches et l'on sait que la formation et le renouvellement des cellules ostéogéniques est assez comparable à ceux des cellules hématopoïétiques⁴.

¹ Friedenstein, A.J. 1976. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47: 327-355.

² Owen, M., Friedenstein, A.J. 1988. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. In: *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 136). pp 42-60.

³ Owen, M., Friedenstein, A.J. 1988. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. In: *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 136). pp 42-60.

³ Bab, I., Ashton, B.A., Gazit, D., Marx, G., Williamson, M.C., Owen, M.E. 1986. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci* 84: 139-151.

⁴ Caplan, A.I. 1991. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthopaed. Res.* 9: 641-650.

Tableau 1: Caractéristiques des cellules souches:

- Multipotentes
- Forte capacité proliférative
- Capacité à recoloniser des tissus multiples à partir des cellules issues d'un seul clone
- Capacité de recolonisation identique à partir d'un clone obtenu *in vitro* ou *in vivo*
- En condition normale, la grande majorité est quiescente

Ces cellules souches ostéogéniques sont disséminées dans le stroma du tissu médullaire⁵. Leur présence au niveau du périoste est beaucoup plus controversée. La capacité ostéogène de celui-ci est-elle due à de véritables cellules souches ou bien à des cellules pré-ostéoblastiques? La mise en culture des cellules n'a pas apporté de réponse satisfaisante. Leur croissance clonale n'est pas établie, pas plus que leur

Tableau 2: différentes lignées cellulaires pouvant provenir de la différenciation de CFU-F.

- CFU-F → **myoblastes** (muscles)
fibroblastes (tendons, ligaments, stroma médullaire, tissu conjonctif)
chondroblastes (cartilage)
ostéoblastes (os)

multipotence.

Les cellules souches ostéogéniques intra-médullaires ont été dénommées CFU-F (*colony-forming unit fibroblasts*) pour leur potentialité à former des clones en culture.

⁵Le tissu médullaire, siège de la formation des lignées hématopoïétiques, contient ce qu'il est convenu d'appeler un tissu stromal assurant la vascularisation, et la synthèse de la trame conjonctive du tissu médullaire. Les cellules de ce tissu stromal (cellules stromales) synthétisent des facteurs protéiques indispensables à la maturation des lignées hématopoïétiques. Plusieurs types de cellules stromales peuvent être distingués: les cellules endothéliales, les péricytes, les fibroblastes, les cellules réticulaires et le adipocytes.

La différenciation de ceux-ci peut-être très variée.

Ceci définit la multipotence des cellules souches. De très nombreux facteurs informatifs ont une influence sur cette différenciation. Ces facteurs sont des hormones, des facteurs de croissances, des cytokines, des eiconasoides ou des molécules de la matrice extracellulaire. Certaines de ces substances agissent comme des substances autocrines ou bien comme des substances paracrines⁶.

Ostéoconduction, ostéoinduction et ostéogénicité

Ostéoconduction : l'ostéoconduction fait appel à la notion de guidage tissulaire. Les matériaux ostéoconducteurs fournissent une trame dans laquelle un tissu de cicatrisation osseux, c'est à dire un tissu conjonctif qui se différenciera par voie directe ou enchondrale en tissu osseux, s'insinue à partir des berges de l'implant. Le matériau n'a aucune influence sur la différenciation ou le métabolisme tissulaire à son contact. Il ne doit pas induire de réaction à corps étranger.

En outre, certains matériaux ont été qualifiés de bioactifs, à savoir qu'ils sont destinés à être des matériaux pouvant modifier la réponse biologique des tissus à leur contact et favorisent, en particulier, la liaison du matériau au tissu osseux l'envahissant. C'est le cas des céramiques d'hydroxyapatite (HA), molécule la plus proche de celles de la phase minérale des os.

Ostéoinduction : les matériaux ostéoinducteurs agissent directement sur la différenciation du tissu conjonctif présent à leur contact. Ils sont capables d'induire l'évolution du phénotype de cellules souches multipotentes en ostéoblastes actifs.

⁶ Trippel, S.B. 1994. Biologic regulation of bone growth. In: Brighton, C.T., Friedlander, G.E., Lane, J.M., (eds) Bone Formation and Repair. American Academy of Orthopaedic Surgeons-Rosemont pp: 39-61.

Ostéogénicité : les matériaux ostéogéniques contiennent des cellules ostéo-progénitrices qui vont subir une évolution phénotypique prédéterminée. C'est le cas des autogreffes osseuses et des tissus bioartificiels.

Indications générales des matériaux de substitution

Pseudarthroses:

Ce sont des anomalies de la cicatrisation qui se manifestent par un blocage de la cicatrisation à un stade antérieur à la formation de tissu osseux.

Arthrodèses:

Ce sont des interventions qui suppriment la mobilité d'une articulation. Elles nécessitent l'établissement d'un pont osseux et peuvent faire l'objet d'une utilisation d'un matériau ostéoconducteur mis au contact de tissu osseux avivé sur les deux pièces à ponter.

Kystes :

Les cavités kystiques caractérisées par une membrane conjonctivo-vasculaire entourant un liquide séreux ou sanguinolent peuvent être comblées par des matériaux ostéoconducteurs lorsqu'ils nécessitent une intervention après ablation de la membrane.

Complements à visée mécanique:

Ils nécessitent l'emploi de substituts ayant des propriétés mécaniques leur permettant une résistance à la compression. C'est le cas par exemple des ostéotomies tibiales.

Contrairement à une opinion largement répandue, la mise en charge précoce des substituts osseux ne favorise pas la cicatrisation osseuse. Au contraire, les mouvements relatifs du substitut osseux par rapport au tissu osseux peuvent l'inhiber.

Reprises de prothèses:

Lors du changement d'une prothèse articulaire, intervention qui devient de plus

en plus fréquente avec l'augmentation de la pose de telles prothèses et de la durée de vie des patients, le chirurgien est souvent confronté à une perte du capital osseux du patient.

Tant au niveau du fémur que du cotyle, l'os s'est lysé en raison de la diminution des contraintes subies par l'os et qui sont assumées par la prothèse. Il faut alors avoir recours à un matériau de substitution.

Les matériaux de comblement osseux.

Tissu osseux autologue :

Il est prélevé chez le patient même, généralement en un seul temps opératoire au niveau des crêtes iliaques et directement implanté dans le défaut. Cet acte préserve la vitalité des cellules osseuses. Néanmoins, lorsque le volume de la greffe est trop important, la fraction des cellules survivantes est faible. La culture de tissu ou de cellules montre que le volume de fragment osseux dans lequel les cellules survivent est peu important.

Un bon modèle d'autogreffe spongieuse est réalisé par le compactage de fragments de trabécules osseux endostés par la râpe du chirurgien lors de la mise en place de prothèses de hanche revêtues d'une couche mince d'hydroxyapatite. Il est constaté dans les premiers jours de l'implantation une prolifération de cellules d'allure fibroblastique venant des fragments de trabécules, probablement à partir des cellules bordantes. Des ostéoblastes se différencient ensuite à partir de ces cellules d'aspect fibroblastiques et constituent au contact de la prothèse un centre d'ossification⁷. On retrouve, quelques semaines à quelques mois après, ces trabécules nécrosés et inclus dans un tissu osseux immature pontant ces

⁷ Frayssinet, P., Hardy, D., Hanker, J.S., Giammara, B.L. 1995. Natural history of bone response to hydroxyapatite-coated hip prostheses implanted in humans. *Cell. Mater.* 5: *in press*

fantômes trabéculaires à l'endoste et au revêtement prothétique.

Le processus d'intégration des greffons osseux et en particulier des autogreffes est un processus multifactoriel connu sous le terme de *creeping substitution*⁸

Le processus commence par l'envahissement des porosités de la greffe par un tissu conjonctif lâche. Ce tissu conjonctif amène des cellules monocytaires qui fourniront des ostéoclastes agissant sur les parois des porosités.

Dans l'os cortical, la résorption des parois de l'axe vasculaire de l'ostéone cesse quand le volume de ce canal a atteint une taille définie et les ostéoblastes s'apposent sur les parois du canal et commencent à déposer les premières lamelles osseuses. Ce processus prédomine à la jonction de la greffe et de l'os receveur.

Plusieurs différences apparaissent entre l'intégration de l'os cortical autologue et de l'os spongieux de même type. Le tissu osseux cortical n'est jamais totalement intégré⁹. En raison de sa structure beaucoup plus dense, la vitesse de revascularisation est très ralentie et résulte en une ostéogénicité très réduite pour les autogreffes corticales comparées aux spongieuses. La réaction ostéoclastique est également bien plus importante pour l'os spongieux que pour l'os cortical.

Les autogreffes vascularisées présentent une survie cellulaire augmentée, une cicatrisation plus rapide et une résorption beaucoup plus faible.

Tissu osseux allogénique :

Le tissu osseux allogène (provenant d'un autre individu) peut également être spongieux ou cortical. Le tissu de greffe, si il est fraîchement prélevé est supposé pouvoir fournir une petite population de cellules ostéogéniques. La plupart du temps, la greffe est congelée ou lyophilisée et ne sert dans ce cas que de trame ostéoconductive.

La séquence d'évènements se déroulant dès l'implantation du tissu allogénique a été diverses fois décrite. L'évènement initial est la formation d'un hématome dans le site d'implantation. Cet hématome contient des PDGF et d'autres facteurs de croissance et cytokines. Une réponse inflammatoire locale suit la résorption de l'hématome. Deux à trois semaines après l'implantation, un infiltrat lympho-plasmocytaire envahit le site de greffe. Cette réaction inflammatoire à composante immunitaire peut décroître lentement ou persister pendant plusieurs mois voire plusieurs années¹⁰.

La persistance de cette réaction inflammatoire inhibe l'intégration osseuse de la greffe.

La décroissance de la réaction inflammatoire permet l'apparition d'un tissu conjonctif lâche autour de la greffe amenant des macrophages qui vont éliminer le tissu médullaire nécrosé contenu dans les porosités de la greffe et des ostéoblastes se différenciant à partir des fibroblastes du tissu conjonctif lâche. Un traitement préalable des allogreffes visant à éliminer ces tissus médullaires et en particulier les graisses qu'il contient favorise l'intégration de l'allogreffon.¹¹

L'envahissement des pores de la greffe par du tissu osseux est précédé, dans le cas de tissu osseux cortical, par un élargissement

⁸ Shaffer, J.W., Field, G.A., Goldberg, V.M., Davy, D.T. 1985. Fate of vascularized and non vascularized autografts. Clin Orthop 197:32.

⁹ Murphey, M.D., Sartoris, D.J., Bramble, J.M. 1992. Radiographic assessment of bone grafts. In: Habal, M.B., Reddi, A.H., (eds) Bone Grafts and Bone Substitute. W.B. Saunders Company. Philadelphia .

¹⁰ Stevenson, S., Horowitz, M. 1992. The response to bone allograft. J Bone Joint Surg 74-A: 939-950.

¹¹ Aspenberg P., Thoren K. 1990. Lipid extraction enhances bank bone incorporation. Acta Orthop.Scand. 61:546-548

des canaux de Wolkman et de Havers par des ostéoclastes qui accompagnent leur revascularisation¹²

L'envahissement des pores de la greffe, une fois nettoyées, par le tissu conjonctif lâche vecteur de cellules souches ostéoblastiques et la néovascularisation entraînent un remodelage du tissu de greffe avec des cycles de résorption et de néoformation de matrice osseuse¹³

Risque immunitaire:

Le risque immunitaire pour les allogreffes osseuses a toujours été considéré faible voire négligé par les chirurgiens, probablement parce que la fonctionnalité mécanique d'une allogreffe osseuse n'est pas toujours parallèle à sa fonctionnalité biologique.

Les antigènes reconnus dans les allogreffes sont principalement les antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH nommé aussi *Human Lymphocyte Antigen*: HLA) glycoprotéines exprimées à la surface des membranes cellulaires. Ces protéines sont divisées en deux classes d'antigène: les antigènes de classe I et de classe II.

De très nombreuses autres protéines, glycoprotéines, et lipides cellulaires et extracellulaires peuvent être reconnues par le receveur et induire une réaction immunitaire d'intensité très variable.

Sur un plan clinique, la greffe a été intégrée lorsque l'interface os receveur/os de greffe a été remodelée de façon à pouvoir supporter une mise en charge. Ceci ne préjuge pas de l'intégration de l'ensemble de la greffe qui est illusoire dans les greffes corticales et assez souvent défailante même pour les greffes spongieuses.

Tissu osseux xénogénique:

Trois points majeurs justifient l'utilisation de tissu osseux d'origine animale :

- ses propriétés mécaniques identiques à celles du tissu osseux humain.
- sa disponibilité illimitée sans problème éthique lié au prélèvement.
- l'absence d'agents infectieux en particulier viraux pouvant être transmis par les allogreffes humaines.

Durant les quatre-vingt dernières années, plusieurs essais d'utilisation de tissu osseux bovin comme matériau de substitution ont été faits. L'os de veau congelé a été utilisé avec des résultats satisfaisants une fois, bien que des expériences exhaustives aient montré que les résultats soient inférieurs aux autogreffes¹⁴.

L'os de veau lyophilisé a également été évalué expérimentalement et cliniquement. Bien que les premiers résultats aient été encourageants, les résultats cliniques à long terme ont été décevants¹⁵. En effet l'antigénicité des différents composants tissulaires des xéno-greffes est importante.

Les antigènes les plus divers et les plus abondants trouvés dans un matériau de greffe sont des protéines. Les antigènes de nature glucidique, lipidique et les acides nucléiques peuvent être reconnus par les cellules B. Néanmoins, ces composés sont les plus faciles à éliminer du matériau de greffe osseuse alors que les protéines de la matrice osseuse le sont beaucoup plus difficilement. De plus, la quasi-totalité de la surface des protéines globulaires est potentiellement immunogène (en fonction de l'espèce immunisée) et consiste en un

¹² Friedlander, G.E. 1987. Current concept review: bone grafts. The basic rationale for clinical applications. J Bone Joint Surg 69-A: 786-790.

¹³ Burchardt, H. 1983. The biology of bone graft repair. Clin Orthop 174: 28-42.

¹⁴ Symposium: symposium sur l'os hétéroplastique. Rev Chir Orthop 45: 1 (1958)

¹⁵ Basset, C.A.L., Creighton, D.K.J. 1962. A comparison of host response to cortical autografts and processed calf heterografts. J Bone Joint Surg 44-A: 842.

continuum d'épitopes multiples se chevauchant¹⁶.

Bases de la réduction du risque immunitaire des xéno greffes osseuses.

La réduction du risque immunitaire pour les xéno greffes osseuses consiste à éliminer de manière physique ou chimique:

- les antigènes du CMH que les cellules médullaires, en particulier, contiennent en grande quantité.
- les antigènes lipidiques. La moelle contient en effet une grande proportion de lipides¹⁷.
- les antigènes protéiques et glycoprotéiques du stroma médullaire.

Le tissu osseux animal peut ainsi être traité par la chaleur ou par des solvants chimiques:

Traitement par la chaleur:

Il doit conduire à un produit entièrement anorganique qui possède une structure cristalline apatitique. En effet, lorsque l'on réalise une analyse thermogravimétrique de tissu osseux on observe une perte de poids qui se réalise en plusieurs étapes ¹⁸:

entre la température ambiante et 200°C : perte d'eau. Si l'on mesure au cours de cette phase les teneurs en hydrogène, en carbone et en azote en fonction du temps, on s'aperçoit que seule la première décroît, indiquant ainsi que seule l'eau est éliminée, la matière organique n'étant pas oxydée à ces températures.

entre 200 et 400°C : la teneur en ces trois éléments diminue et à 400°C il ne reste plus d'azote, indiquant une oxydation complète de la matière organique. Cette oxydation a lieu en deux étapes comme le confirme

l'analyse thermogravimétrique, la dérivée de la perte de poids en fonction de la température présente en effet deux pics.

entre 500 et 800°C : perte des carbonates de l'apatite de l'os. Ces ions sont liés au réseau cristallin de l'hydroxyapatite.

Au-delà de 800°C, il ne reste plus que le réseau cristallin de l'hydroxyapatite qui peut subir des modifications en fonction de la température atteinte lors du traitement thermique.

Ce type de matériau est généralement friable et cassant. Il est comparable de ce point de vue aux céramiques d'hydroxyapatite de synthèse. Comme celles-ci, ces xéno greffons anorganiques sont bien tolérés et progressivement remplacés par du tissu osseux néoformé. C'est l'absence du collagène de structure du tissu osseux qui induit la perte des propriétés mécaniques et qui explique l'intérêt pour les traitements chimiques qui le préservent.

Traitement par des solvants chimiques:

Divers types d'os bovin déprotéinés ou partiellement déprotéinés ont été utilisés et évalués en chirurgie humaine. Ils ont tous subi au moins une étape de dégraissage et de déprotéination des cavités médullaires. Ces étapes sont effectuées par voie chimique: éthylènediamine pour la délipidation, peroxyde d'hydrogène ou hydroxyde de potassium pour la déprotéination des cavités médullaires¹⁹.

L'os de Kiel est le matériau qui a été le plus utilisé comme xéno greffe osseuse en clinique humaine et est toujours disponible commercialement (Surgibone®). Il dérive d'os bovin lavés à l'eau, dont la matrice protéique a été partiellement extraite par du peroxyde d'hydrogène, et dont le contenu

16 Male, D., Champion, B., Cooke, A. 1988. Antigénicité des protéines. Dans: Immunologie. Le système immunitaire et sa régulation. MEDSI/McGraw-Hill. London

17 Thoren K, Aspenberg P and Thorngren KG. 1995. Lipid extracted bank bone. Clin. Orthoped. Rel. Res. 311:232-246

18 Legros, R., Godinot, C., Torres, L. Mathieu, J. et Bonel, G. 1982. Sur la stabilité thermique des carbonates du tissu osseux. J. Biol. Buccale 10: 3-9.

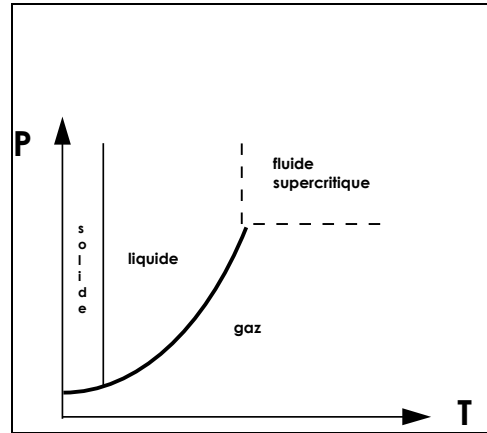
19 G.E.S.T.O. 1994. Les substituts osseux en 1994. Monographie éditée sous l'égide de la société Française de chirurgie orthopédique et traumatologique.

lipidique a été enlevé par des solvants des graisses puis stérilisé à l'oxyde d'éthylène.

Traitement par les fluides supercritiques

Récemment est apparu le traitement des xénogreffes par le dioxyde de carbone à l'état supercritique dans lequel les lipides sont particulièrement solubles²⁰ (Oxbone®). Les fluides super-critiques c'est-à-dire au-delà du point critique qui termine la courbe de vaporisation d'un corps pur (voir graphe) ont une viscosité dynamique faible (proche de celle d'un gaz), un coefficient de diffusion élevé, une très faible tension interfaciale et une masse volumique élevée (proche de celle d'un liquide). Ils sont donc capables de diffuser dans les solides micro-poreux sans aucun problème de mouillabilité et avec un pouvoir solvant élevé que l'on peut moduler en faisant varier la pression. Parmi les fluides utilisables, le CO₂ a été choisi car il présente en effet de nombreuses propriétés intéressantes pour cette utilisation:

- sa température critique, de 31°C, est basse. On peut donc travailler à des températures auxquelles aucune altération du tissu osseux n'est possible. Sa pression critique, de 73,8 bars nécessite en revanche des installations adaptées aux hautes pressions.



- son pouvoir solvant est excellent, en particulier pour les lipides. Or ces lipides sont présents en grande quantité dans les tissus médullaires qui imprègnent l'os spongieux; ils provoquent des réactions inflammatoires, peuvent être antigéniques et sont toujours très difficiles à éliminer totalement.

- il n'a pas d'action sur le collagène du tissu osseux qui est essentiel tant sur le plan des propriétés biomécaniques de l'os que sur celui de l'ostéointégration du greffon²¹.

- c'est un produit naturel, facile à se procurer et dépourvu de toute toxicité.

Cette méthode présente donc l'avantage de disposer pour le traitement d'un fluide ayant grossièrement les propriétés de diffusion d'un gaz et les propriétés de solubilisation d'un liquide.

Ce procédé constitue une avancée significative puisque l'on peut pour la première fois traiter de manière très efficace le tissu osseux sans faire appel ni à la chaleur ni à des solvants organiques, seules méthodes connues jusqu' alors pour le traitement de l'os et qui présentent chacune de sérieux inconvénients: dénaturation ou altération des protéines du tissu osseux, présence de résidus toxiques,...

²⁰Fages J., Marty A., Delga C., Condoret J.S., Combes D. and Frayssinet P. 1994. The use of supercritical CO₂ for bone delipidation. *Biomaterials*. 15(9): 650-656

²¹Fages J., Frayssinet P., Asimus E., Mathon D., et Autefage A. 1995. Comportement *in vivo* d'un tissu osseux traité par fluide supercritique. *Rev. Med. Vet.* 146 (10): 655-662

Après cette délipidation particulièrement poussée une déprotéination des cavités médullaires par des agents oxydants classiques (H_2O_2) ou des enzymes protéolytiques s'en trouve facilitée.

Enfin, il faut noter que ce procédé est utilisable avec les allogreffes. C'est sans doute dans le traitement et la sécurisation des os de banque qu'il est appelé à se développer le plus significativement.

Risque lié à la « maladie de la vache folle »

Récemment un risque infectieux nouveau est apparu en raison d'une maladie à prions: l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Elle est apparue ou plutôt réapparue en Grande-Bretagne en 1986 (voir tableau 3). Elle constitue une nouvelle entité d'un groupe de maladies neuro-dégénératives connues chez l'homme et chez l'animal.

Ces maladies, rassemblées sous le nom d'Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) ont des caractéristiques cliniques et lésionnelles communes et obéissent à des mécanismes étio-pathogéniques très semblables, bien qu'imparfaitement connus. Elles sont en effet transmises par des agents infectieux non conventionnels ou prions²². Il s'agit de l'isoforme anormale PrP^{Sc} d'une glycoprotéine normalement présente chez l'hôte à la surface des neurones, la PrP^c sans que l'on sache si cette protéine est la cause ou la conséquence de la maladie. La PrP^{Sc} et la PrP^c ont la même structure primaire; seul un traitement à la protéinase K permet de les différencier. L'hypothèse la plus vraisemblable mais non démontrée formellement, est que la PrP^c a la capacité de convertir la PrP^c en PrP^{Sc} et propage ainsi la maladie. En outre, une controverse subsiste dans la communauté scientifique quant à l'association ou non de cette protéine

avec un acide nucléique qui serait encapsidé dans la PrP^{Sc}. Aucun microorganisme conventionnel (bactérie ou virus) n'a jamais pu être mis en évidence ni directement ni indirectement. En particulier il n'y a ni réaction immunitaire, ni réponse inflammatoire.

Il existe de multiples preuves (expérimentales et épidémiologiques) de la difficulté de transmission d'une espèce à l'autre. Néanmoins, l'apparition de l'épizootie chez les bovins s'est faite par une contamination alimentaire des bovins nourris par des farines de viandes préparées à partir d'ovins infectés par l'agent de la tremblante du mouton²³.

Tableau 3: Les cas d'ESB en Europe

ESB	Nbe de cas au 1/3/96	% du total
Royaume-Uni	161663	99,77
Suisse	203	0,13
Irlande	123	0,08
France	16	< 0,01
Portugal	31	< 0,01
TOTAL	162039	100,00

Ces farines sont devenues contaminantes après la suppression d'une étape de délipidation ayant supprimé l'inactivation de l'agent infectieux. Il apparaît donc que bien que jamais constaté, le risque de transmission de l'agent de la BSE à l'homme ne peut-être écarté.

Diverses mesures ont été prises par la CEE pour prévenir la transmission de l'agent

²² Savey M., Baron T. 1994. La BSE: un risque pour la santé publique? Rev Med Vet 145: 819-827

²³ Bradley R. 1994. Bovine spongiform encephalopathy epidemiology: a brief review. Livest. Prod. Sci. 38: 5-16.

infectieux à l'homme. Ces mesures concernent la prévention du risque professionnel, la prévention du risque de transmission alimentaire des bovins à l'homme et la prévention du risque de transmission iatrogène qui concerne directement les biomatériaux d'origine bovine.

Pour ce qui concerne ce dernier risque l'élément essentiel est l'origine des tissus utilisés, donc des bovins dont ils sont issus. A lui seul, théoriquement, ce seul élément devrait suffire à garantir l'innocuité du médicament, mais les difficultés liées au diagnostic de la maladie et à l'identification des infectés non malades ne permettent pas de se reposer sur ce seul critère. A noter que l'utilisation de jeunes bovins chez lesquels la maladie n'a jamais été observée n'est pas en soi une garantie compte-tenu des longs temps d'incubation de la maladie.

D'autres critères doivent donc être examinés pour juger de l'innocuité du médicament et notamment le type de tissu utilisé, la voie d'administration et la quantité de tissu et de doses administrés et les procédures appliquées au cours de la fabrication pour réduire ou éliminer l'infectiosité. Les prions sont résistants à la plupart des traitements classiques de stérilisation et notamment l'utilisation de formol, l'irradiation et la chaleur sèche. L'un des 3 traitements suivants doit être obligatoirement inclus dans le procédé de fabrication des tissus: passage soit dans la soude (1M ou 2M) soit dans l'hypochlorite de sodium (2% de chlore libre) ou encore autoclavage pendant 1h à 132°C.

La Direction de la Pharmacie et du Médicament applique l'ensemble des mesures prévues par l'OMS et une note explicative a été diffusée dès Mai 1992. Dix neuf médicaments ont été retirés du marché en Juin 1992 et pour treize autres les lots contenant des tissus bovins ont été retirés et ils feront l'objet d'une modification de formule. Les médicaments visés contenaient

des tissus appartenant aux classes I et II de l'OMS²⁴.

Les substituts osseux à base d'os bovin n'ont pas fait l'objet de telle mesure car ils font partie de la classe IV de l'OMS dans laquelle l'infectiosité est non détectable.

Tableau 4: Niveaux infectieux des tissus et des fluides corporels d'animaux infectés en phase clinique (circulaire CEE 92-0032).

Classe 1 forte infectivité	Système nerveux central
Classe 2 infectivité moyenne	Organes lymphopœïétiques: rates, ganglions, amygdales, cœlon proximal, LCR, dure-mère, placenta, hypophyse, surrénales
Classe 3 infectivité faible	nerf sciatique, moelle osseuse, cœlon distal, poumon, foie, pancréas, thymus, muqueuse nasale, glande pituitaire
Classe 4 infectivité non détectée	Muscles squelettiques, coeur, reins, mamelles et lait, ovaires, vésicules séminales, caillot sanguin et sérum, glande salivaire, fèces, tissus foetaux, bile urine, tissu osseux, cartilagineux et fibreux, peau.

Céramiques phosphocalciques.

Elles sont le plus souvent constituées d'hydroxyapatite qui est un phosphate de calcium cristallin de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dont la biocompatibilité est bien établie. L'intégration des céramiques se fait suivant une séquence d'évènements identique à celle des greffes osseuses:

- formation d'un hématome

²⁴ WHO. 1992. Public health issues related to animal and human spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 70: 183-190

- résorption de l'hématome et envahissement par un tissu conjonctif lâche.
- différenciation d'ostéoblastes à partir des fibroblastes du tissu conjonctif lâche.
- formation d'un tissu osseux immature dans le site d'invasion du tissu conjonctif
- remodelage et transformation en tissu osseux mature.

Ces céramiques ne servent que de matériaux d'expansion et de guidage de la réaction de cicatrisation²⁵. Elles ne peuvent tenir leur rôle que lorsque elles sont envahies par un tissu contenant des cellules à différenciation ostéoblastique prédéterminée²⁶.

Les céramiques subissent un procédé de *creeping substitution* identique aux auto- ou allogreffes²⁷. En effet, elles sont constituées de grains de phosphates de calcium assemblés par des joints de grains constitués lors de transferts de matière entre les grains lors de l'étape de frittage. Ces joints constituent des zones de fragilité où se fait préférentiellement la dissolution par les fluides extracellulaires et/ou par l'action des ions H^+ synthétisés par les ostéoclastes dans leur chambre de résorption²⁸. La dégradation des joints de grains aboutit à la libération de grains de phosphate de calcium phagocytés par les macrophages et solubilisés dans les compartiments cellulaires à bas pH de la cellule (lysosomes). Cette dégradation est suivie d'une synthèse de matrice osseuse dans la zone de résorption comme dans tous les

processus de résorption- reconstruction de la matrice osseuse.

La dégradation de la céramique est très variable suivant les caractéristiques physico-chimiques de celle-ci. Elle augmente avec la porosité, la surface spécifique ou la présence de phase relativement plus soluble que l'HA au pH considéré comme le phosphate tricalcique β .

Les exosquelettes coralliens.

Ils sont constitués de carbonate de calcium sous forme d'aragonite. Ils ont une architecture particulière suivant l'espèce corallienne. Le déroulement de leur ostéointégration n'est pas différent de celle des céramiques. Le processus de *creeping substitution* entraîne néanmoins une résorption rapide car les carbonates de calcium sont des composés plus solubles que les phosphates de calcium. Des plus les ostéoclastes contiennent une enzyme pouvant dégrader spécifiquement les carbonates de calcium : l'anhydrase carbonique.

Limites d'efficacité des matériaux ostéoconducteurs.

Les autogreffes sont le matériau idéal : propriétés mécaniques du tissu osseux, absence de risque infectieux, ostéogénicité, absence de risque immunogène. Malheureusement, leur disponibilité est très réduite et les inconvénients du prélèvement : douleur, saignement, risque infectieux, font qu'elles sont souvent mal acceptées par le patient.

A l'exception des autogreffes, les matériaux de substitution ont montré des limites à leur intégration par le tissu osseux qu'ils sont censés remplacer. Ces limites sont dues en grande partie à l'état physiologique des tissus supplémentés qui manquent, la plupart du temps, des cellules ostéogéniques différenciées et des facteurs protéiques de la matrice extracellulaire permettant d'obtenir cette différenciation. Les matériaux poreux de

²⁵Holmes, R.E. 1994. Osteoconduction in hydroxyapatite-based materials. In: Brighton, C.T., Friedlander, G.E., Lane, J.M., (eds) Bone Formation and Repair. American Academy of Orthopaedic Surgeons-Rosemont pp: 355-367.

²⁶Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Asimus E, and Autefage A. 1993. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*, 14 (6): 423-429.

²⁷Fages, J., Frayssinet, P. 1993. Les substituts osseux: des os comblés. *Biofutur*, 136: 32-37

²⁸Frayssinet, P., Rouquet, N., Tourenne, F., Fages, J., Bonel, G. 1993. *In vivo* degradation of calcium phosphate ceramics. *Cell. Mater.* 4: 383-394.

comblement, exceptés les tissus osseux d'autogreffes qui peuvent contenir des cellules ostéoprogénitrices, sont des matériaux ostéoconducteurs et sont donc dépendants du processus de cicatrisation osseuse.

Les allogreffes présentent des avantages intéressants pour le chirurgien : morphologie adaptée et insertions tendineuses et ligamentaires, présence de surfaces articulaires, propriétés mécaniques osseuses. En revanche, leur disponibilité devient très réduite et l'immunogénicité de ces matériaux est assez importante pour rendre leur ostéointégration aléatoire²⁹. Enfin et surtout le risque infectieux bien que faible n'est pas à négliger comme le montre les cas de SIDA ou d'hépatites transmis par des allogreffes³⁰. Un traitement des allogreffes pour inactivation virale est appelé à devenir la règle dans les années qui viennent. Des travaux en cours dans notre laboratoire montrent que l'utilisation des fluides supercritiques est vraisemblablement un bon candidat pour atteindre cet objectif.

Les xéno greffons convenablement traités ni d'ailleurs aucun des autres substituts osseux ne sont ostéoinducteurs.

Les céramiques et les exosquelettes coralliens présentent une disponibilité totale, aucun risque infectieux ni immunogène. Néanmoins, leur faible propriété mécanique empêche leur remise en charge avant intégration complète et compromet souvent une bonne fixation empêchant les micromouvements du matériau.

Perspectives d'avenir: les matériaux ostéoinducteurs et ostéogéniques.

Matériaux ostéoinducteurs:

Différentes substances paracrines ou autocrines constituées de facteurs de croissance et des facteurs morphogènes ainsi que des hormones et eiconasoides interviennent dans la régulation de l'activité et de la différenciation des ostéoblastes aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

Assez paradoxalement, peu de ces substances ont été expérimentées comme biomatériaux ostéoinductifs ou associées à un autre matériau pour lui donner un caractère ostéoinductif.

La plupart des molécules responsables de l'ostéoinduction appartiennent à un groupe de protéines de la famille du TGF- β : les BMP³¹ (*bone morphogenetic proteins*).

Bien que les BMP aient été identifiées comme les protéines qui induisent une formation de tissu osseux dans des sites ectopiques^{32,33}, d'autres fonctions que celle-ci ont été mises en évidence dans le processus de la morphogenèse et de la différenciation cellulaire.

²⁹ Stevenson, S. 1987. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 69-A: 573-582.

³⁰ Salzman N.P., Psallidopoulos M., Prewett AB. and O'Leary R. 1993. Detection of HIV in bone allografts from AIDS autopsy tissue. *Clin. Orthop.* 292:384-390

³¹ Yamaguchi, A. 1995. Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor- β superfamily. *Semin Cell Biol.* 6: 165-173.

³² Urist, MR., Iwata, H., Ceccotti, PL, *et al.* 1973. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70: 3511-3515.

³³ Reddi, A.H. 1982 Regulation of local differentiation of cartilage and bone by extracellular matrix: a cascade type mechanism. in: Kelly, R.O., Goetinck, P.F., and MacCabe, J.A., (eds): limb development and regeneration. New York, Alan R. Liss. pp: 261.

Tableau 5: membres de la famille des BMP. Les molécules dpp et 60A existent chez la drosophile et la Vg1 existe chez la *Xenopus*. Les autres protéines sont présentes chez les mammifères

BMP-2
BMP-3
BMP-4
BMP-5
BMP-6
OP1/BMP-7
OP2/BMP-8
BMP-9
Nodal
dpp
60A
Vg1
GDF1
GDF3/VGR2
dorsalin

Ces molécules sont présentes chez la levure ainsi que chez l'animal, de la drosophile aux mammifères avec une très forte homologie parmi les différentes espèces³⁴. Ceci suggère un rôle important de la famille des BMP, autre que la formation de tissu osseux ectopique.

Le mécanisme d'ossification enchondrale ectopique induit *in vivo* par les BMP est un mécanisme de développement séquentiel dans lequel interviennent de nombreuses étapes:

1. chimiotactisme de cellules progénitrices
2. prolifération de cellules mésenchymateuses
3. différenciation de chondrocytes
4. calcification de la matrice cartilagineuse
5. angiogénèse et invasion vasculaire
6. différenciation osseuse et minéralisation
7. remodelage osseux et différenciation médullaire.

Les BMP-2 et 3 (ostéogénine) se sont

révélées être les plus actives sur l'ostéogénèse.

Le rôle de la BMP-2 dans la différenciation de la cellule ostéoblastique a été défini *in vitro* sur des cultures de cellules mésenchymateuses progénitrices multipotentes (lignée 10T1/2). La BMP-2 accroît fortement l'activité phosphatase alcaline de ces cellules qui est un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique. De même la production d'AMPc-PTH dépendante est accrue par la BMP-2. Bien que cette lignée ne produise pas d'ostéocalcine, la BMP-2 induit la synthèse de cette molécule qui est un marqueur tardif de la différenciation ostéoblastique. Les BMP induisent la différenciation des précurseurs des ostéoblastes en ostéoblastes matures.

Deux types de BMP sont disponibles suivant leur mode de production. Le premier est un mélange complexe de protéines obtenues par extraction et purification à partir des matrices extracellulaires osseuses ou humaines. Le second est une BMP2 recombinante humaine (rhBMP2) obtenue par génie génétique et produite par des cellules CHO. Elle a prouvé avoir une efficacité dans la régénération osseuse pour diverses applications chez l'animal que ce soit comme matériau de fusion vertébrale, comme matériau provoquant la cicatrisation d'ostéotomie ou de défauts des os longs, ou en chirurgie maxillo-faciale et stomatologique.

Il est apparu que cette protéine pour être active et manipulable chirurgicalement, peut-être couplée à des matériaux solides tels que des céramiques de phosphate de calcium³⁵ ou des exosquelettes coralliens, des polymères divers tels que des polymères de l'acide lactique, du PTFE³⁶ ou

³⁵ Sato T., Kawamura M., Sato K., Iwata H., Miura T. 1991. Bone morphogenesis of rabbit bone morphogenetic protein-bound hydroxyapatite-fibrin composite. Clin Orthop Res 263: 254-263

³⁶ Hedner E., Linde A. 1995. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes - an experimental study in rat mandibular defects. Eur J Oral Sci 103: 236-241.

³⁴ Kingsley, DM. 1994. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes Dev 8: 133-146 (1994)

du collagène³⁷, des allogreffes osseuses³⁸ et même certains matériaux métalliques.

Matériaux ostéogéniques

Le couplage d'un élément cellulaire à un matériau de comblement ostéoconducteur constitue un organe hybride ou bioartificiel et confère à ce matériau des propriétés ostéogéniques.

Deux grands types de matériaux ostéogéniques peuvent être individualisés selon le mode d'association des cellules au matériau:

- Des cellules souches osseuses multipotentes peuvent être prélevées par ponction biopsie médullaire, adsorbées sur des céramiques de phosphate de calcium et réimplantées dans le même temps opératoire³⁹.

- Des cellules pluripotentes peuvent être prélevées par digestion collagénasique de la matrice protéique de biopsie osseuse ou obtenues par migration des cellules sur un support plan à partir de la trame de biopsie de tissu spongieux. Une fois obtenu ces cellules peuvent être multipliées *in vitro* afin de disposer de nombreuses cellules ostéogéniques avant de les fixer sur un vecteur (céramique) et les réimplanter dans un second temps opératoire⁴⁰. Le passage de la lignée *in vitro* présente deux inconvénients: elle oblige à un second temps opératoire différé de plusieurs semaines et il existe une dédifférenciation de la lignée

cellulaire pendant la période de culture. Elle présente néanmoins des avantages: celui de mettre à disposition de très nombreuses cellules ostéogéniques et de permettre de pouvoir intervenir sur le phénotype cellulaire pendant la culture grâce à des facteurs morphogènes, de croissance ou de cytokines. La faisabilité et l'efficacité de telle greffe de cellules autologues a été montré chez l'animal de laboratoire ou le gros mammifère en un ou deux temps. De même, des greffes de cellules osseuses autologues chez l'homme ont montré leur intérêt⁴¹.

Néanmoins, de très gros progrès restent encore à faire pour augmenter le rendement des cultures. La spécificité des cellules mises en culture doit être augmentée et la différenciation doit pouvoir être orientée en culture.

Des anticorps monoclonaux contre des cellules souches mésenchymateuses pouvant donner des clones à phénotype ostéoblastique ont été synthétisés et dans un proche avenir permettront de purifier ces cellules par trieur de cellules ce qui serait un progrès considérable dans la reproductibilité et l'augmentation du rendement de culture⁴².

³⁷ Swoboda HF., Wimmer FM., Pfeiffer K., Schmidt KH. 1990. Ectopic bone induction by partially purified bone extract alone or attached to biomaterials. *Biomater Artif Cell Artif Org* 18: 383-401.

³⁸ Toriumi DM., Kotler HS., Luxenberg DP., Holtrop ME., Wang, EA. 1991. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 117: 1101-1112.

³⁹ Goshima J., Goldberg, VM., Caplan A.I. 1991 The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop Res* 269: 275-282.

⁴⁰ Frayssinet P., Autefage A., Primout I., Guilhem A., Rouquet N. Bonnevielle P. 1991. Bone cell graft in bioreactor. A study of feasibility of bone cells autograft in large defects. *J. Mater.Sci. Mater.Med.* 2: 217-221.

⁴¹ Connolly JF. 1995. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Rel Res* 313: 8-18.

⁴² Bruder S.P., Lawrence E.G., Hayneworth S.E. 1995. The generation of monoclonal antibodies against human osteogenic cells reveals embryonic bone formation *in vivo* and differentiation of purified mesenchymal stem cells *in vitro*. Abstract of 41st Annual Meeting Orthopaedic Research Society, February 13-16, 1995, Orlando, Florida.

Conclusions.

Aujourd'hui, l'autogreffe reste à juste titre la greffe de prédilection des chirurgiens orthopédistes.

Lorsqu'elle n'est pas possible, diverses solutions s'offrent à eux. Plusieurs types de matériaux sont à leur disposition pour favoriser une reconstruction tissulaire.

Toutefois les limites actuelles de ces matériaux appellent la mise au point de matériaux plus performants qui ne sont encore définis que dans leur principe. Ils résultent de l'association d'éléments dérivant du vivant avec des matériaux synthétiques et sont sans aucun doute promis à un avenir à la mesure des besoins qui sont apparus.