

Thérapie cellulaire des grandes pertes de substance osseuse

L'os est un tissu remarquable pour sa capacité à régénérer. Il échappe à la règle générale selon laquelle, chez les mammifères, la survenue d'une plaie déclenche un mécanisme de réparation non spécifique conduisant à la formation d'un tissu fibreux. L'apparition d'une lésion au niveau du tissu osseux déclenche, en effet, une cascade biologique récapitulant dans une certaine mesure la formation osseuse chez l'embryon. Elle aboutit à la formation, non pas d'un tissu fibreux, mais d'un tissu osseux. Pour preuve, la grande majorité des fractures osseuses réparent spontanément le déficit osseux. Le processus biologique sous-jacent est considéré comme optimal et l'intervention humaine se limite à stabiliser mécaniquement la lésion.

Cependant, on observe dans 5 à 10 % des cas un retard ou une absence de consolidation. L'absence de consolidation correspond souvent à la formation d'un mélange de tissus fibreux et osseux. Elle ne permet pas la restauration de la continuité osseuse. La fonction mécanique première du tissu osseux ne peut dès lors plus être assurée. De plus, il existe des indications thérapeutiques spécifiques pour lesquelles il est nécessaire de réséquer des segments osseux de taille importante, par exemple dans certaines pathologies tumorales, infectieuses ou traumatiques. La reconstruction d'un os fonctionnel dans ces grandes pertes de substance osseuse demeure problématique. L'importance du déficit (parfois plusieurs centimètres sans os intact) est trop importante pour autoriser une néoformation osseuse. Nous limiterons notre exposé aux traitements de ces grandes pertes de substance par thérapie cellulaire, application la plus probable à court terme de cette nouvelle technique.

Le tissu osseux : un candidat de choix pour la thérapie cellulaire

Sa structure simple, son aptitude naturelle à régénérer ainsi que la possibilité d'amplifier aisément des cellules ayant un potentiel de différenciation osseuse à partir d'un prélèvement de moelle osseuse font du tissu osseux un candidat de choix pour la thérapie cellulaire. Le but va être de stimuler un processus de régénération existant naturellement et non de le créer *de novo*. Le principe va consister à transplanter, au niveau de la lésion, des cellules ayant un potentiel de différenciation osseuse. Ces cellules ne sont pas injectées directement mais préalablement mises en place dans un matériau servant de support.

Source de cellules

Théoriquement, on pourrait utiliser toute cellule capable de différenciation en ostéoblaste. Cependant, nous sommes dans un cas de chirurgie de confort. La vie du patient n'est pas en question. Il paraît donc difficile d'envisager l'utilisation de cellules allogéniques requérant l'utilisation d'immunosuppresseurs. La majorité des essais effectués jusqu'à présent l'ont donc été avec des cellules autologues.

Des résultats intéressants ont pu être obtenus par injection extemporanée de moelle osseuse dans le cas de fractures n'ayant pas consolidé spontanément. Cependant, la moelle osseuse comprend peu de progéniteurs ostéoblastiques (0,01 %) et ce nombre diminue avec l'âge, limitant l'efficacité de cette approche (*pour revue voir* [1]). Depuis une dizaine d'années, de nombreuses équipes ont exploré la possibilité d'utiliser les fibroblastes du stroma de la moelle osseuse

comme source de cellules compétentes pour la réparation osseuse. Ces cellules sont obtenues en mettant en culture des cellules de moelle osseuse dont on ne conserve que la fraction adhérente. C'est Friedenstein qui a donné les premières preuves de l'existence de cellules progénitrices du tissu osseux dans la moelle osseuse [2]. Il fut ensuite démontré que les fibroblastes se différenciaient en ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes ou myoblastes et ce, en fonction des conditions de culture (*pour revue voir* [3, 4]). La pluripotentialité des fibroblastes humains a été prouvée *in vitro* par Pittenger [5]. Ces cellules sont souvent appelées de façon inappropriée cellules souches du mésenchyme : les fibroblastes ne possèdent en effet pas de capacité d'autorenouvellement et dégèrent *in vitro* après environ 38 doublements [6]. Leur nombre peut cependant être amplifié de façon importante, par un facteur 10^9 sans perte de leur activité ostéogénique [6]. La présence de dexaméthasone, d'acide ascorbique et de β -glycérophosphate permet leur différenciation en ostéoblastes [7]. Leur intérêt thérapeutique a été démontré chez le petit animal en greffant dans un site ectopique des fibroblastes préalablement ensemencés dans un biomatériau poreux (*voir plus loin*) [8]. Un mois après la greffe, la formation d'un tissu osseux sur les surfaces de la céramique était observée. L'abondance du tissu osseux néoformé et sa cinétique de formation étaient fonction du nombre de cellules transplantées. La formation osseuse avait lieu de façon plus efficace lorsque la différenciation des fibroblastes en ostéoblastes avait été induite avant leur implantation [9, 10].

Bien que l'emploi de chondrocytes ou de cellules du périoste ait aussi été

exploré [11], l'utilisation des fibroblastes semble actuellement s'imposer. Le prélèvement par ponction-aspiration est un geste classique. Les fibroblastes se multiplient et se différencient dans des milieux de culture non sophistiqués. Enfin, ils peuvent être congelés sans altération de leurs potentialités [6].

Cahier des charges du matériau support

La formation osseuse requiert un support physique sur lequel les ostéoblastes adhèrent, migrent et prolifèrent. Ce processus est toujours accompagné d'une néovascularisation, d'où la sélection de matériaux poreux. Idéalement, les pores doivent être interconnectés afin de favoriser une angiogenèse rapide et complète de l'implant. Leur taille doit être supérieure à 150 μm pour permettre la néoformation osseuse [12]. Le but ultime étant d'obtenir un comblement du défaut par de l'os, l'utilisation d'un matériau résorbable sera préférée: l'idéal est que le matériau se résorbe parallèlement à l'ostéogenèse de manière à profiter, au départ, des propriétés mécaniques du matériau et à obtenir ultérieurement son remplacement complet par du tissu osseux. L'une des difficultés majeures de la thérapie cellulaire réside dans la réalisation d'un matériau répondant à ces critères. De très nombreux matériaux ont été évalués: polymères d'acide lactique et glycolique, collagène, alginate, céramiques. Actuellement, les céramiques à base de phosphate de calcium sont, avec le corail, les supports les plus prometteurs pour cette application (*pour revue voir* [1]).

Études pré-cliniques chez l'animal

Les études chez l'animal ont pour but d'optimiser les différents paramètres de la technique puis de démontrer son efficacité. Cette démonstration doit être faite dans des modèles mimant au mieux l'indication clinique et avoir pour contrôle les techniques plus simples permettant d'obtenir les mêmes résultats. L'application clinique première de la thérapie cellulaire étant le comble-

ment des grandes pertes de substance osseuse, les études ont évalué l'intérêt de la thérapie cellulaire dans ces modèles, soit au niveau du crâne, soit au niveau des os longs et ont toujours inclus deux contrôles: l'absence de traitement, et l'utilisation du matériau support seul. Ces deux traitements ont systématiquement donné des résultats inférieurs à ceux qui sont obtenus avec la thérapie cellulaire. Il est regrettable que ces études n'aient pas inclus un autre groupe contrôle: des défauts osseux comblés par de l'autogreffe, technique de référence dans cette indication clinique. La lourdeur de cette chirurgie explique très certainement cette lacune.

Les premières études ont été effectuées en site orthotopique, essentiellement chez le rat. Le traitement des lésions (défaut de 6 mm au niveau du fémur) par thérapie cellulaire permet un rétablissement de la continuité osseuse. Histologiquement, on observe la formation d'un tissu osseux au contact direct de la céramique sur laquelle des fibroblastes avaient étéensemencés [13, 14]. La pertinence clinique de ces résultats est cependant discutable étant donnée la petite taille des défauts osseux créés.

L'étape suivante a donc été de poursuivre les investigations dans des modèles plus proches de la réalité clinique. Les auteurs ont alors cherché à combler des défauts osseux de taille importante au niveau d'os chargés mécaniquement chez le gros animal afin de mimer au mieux l'indication clinique. Bruder *et al.*, en 1998, ont pu ainsi montrer que des pertes de substance de 21 mm au niveau du fémur chez le chien ne consolident ni spontanément, ni lorsqu'elles sont comblées avec une céramique biphasée à base d'HA/ β -TCP (tricalcium phosphate-hydroxyapatite); en revanche, l'ajout de fibroblastes à la céramique entraîne une augmentation de la formation osseuse [15]. Cependant, trop fragile, le matériau a tendance à se fracturer. Sa résorption trop lente conjuguée à l'absence d'interconnexion des porosités rend difficile la néoformation osseuse. On observe une apposition d'os au contact d'une céramique plutôt

qu'une incorporation du matériau par l'os. Il n'y a pas de véritable régénération du tissu osseux.

C'est dans ce cadre que nous avons évalué une céramique naturelle: l'exosquelette de corail du genre *Porites*. Ce matériau présente des propriétés mécaniques élevées en compression et des pores totalement interconnectés. Il est composé essentiellement de carbonate de calcium sous forme d'aragonite. Il se résorbe plus rapidement que les HA/ β -TCP. Nous l'avons utilisé seul ou après adjonction de moelle osseuse immédiatement après son prélèvement ou de fibroblastes pour combler des défauts osseux de 25 mm chez le mouton au niveau d'un os chargé mécaniquement: le métatarsien [16]. L'environnement vasculaire et musculaire minimal rend ce site très hostile à la réparation osseuse spontanée. Dans cette étude, les pertes de substance laissées vides ou comblées avec du corail seul ou accompagné de moelle fraîche, sont envahies par un tissu fibreux. Il n'y a aucun rétablissement de la continuité osseuse. En revanche, on obtient un rétablissement de la continuité osseuse par la constitution d'une corticale dans 6 cas sur 7 lorsque le corail est supplémenté avec des fibroblastes (*figure 1*). Fait surprenant, dans les cas les plus favorables, on observe un processus de remodelage de l'implant conduisant à la formation d'un anneau d'os cortical quasi normal creusé en son centre par une cavité médullaire. Ces résultats prometteurs doivent cependant être encore améliorés. Nous n'avons observé de consolidation clinique chez le mouton que dans 3 cas sur 7. De plus, il faudra démontrer que cet os est mécaniquement compétent.

Conclusions

Les résultats précliniques de la thérapie cellulaire sont encourageants. Ils restent cependant suboptimaux et il ne serait pas raisonnable de franchir l'étape clinique sans optimiser et normaliser les techniques de préparation des implants ainsi qu'évaluer d'autres matériaux pouvant servir de support aux fibroblastes. La thérapie cellulaire est en concurrence avec

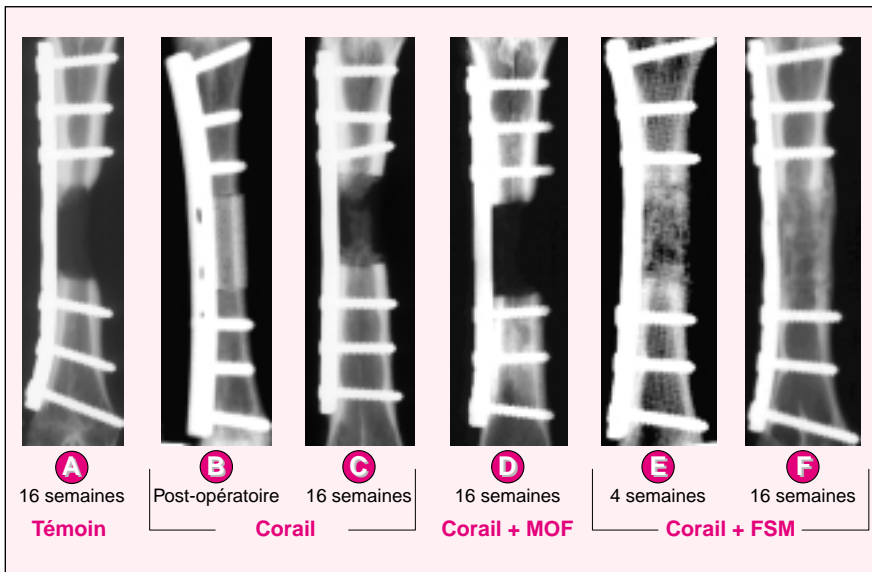


Figure 1. **Comblements de défauts osseux chez le mouton.** Radiographies des métatarsiens après 0, 4 ou 16 semaines. Des défauts non comblés (A) ou comblés avec du corail seul (B, C), du corail et de la moelle fraîche (MOF) (D) ne réparent pas après 16 semaines. En revanche, un défaut osseux comblé avec du corail supplémenté par des fibroblastes du stroma de la moelle osseuse a consolidé après 16 semaines (E et F).

d'autres méthodes alternatives, dont l'utilisation de matériaux supplémentés par des protéines intervenant dans la morphogénèse osseuse et l'utilisation de l'autogreffe. Chacune de ces techniques a probablement sa place dans l'arsenal du clinicien. Les études pré-cliniques et cliniques permettront de déterminer leurs indications thérapeutiques respectives.

1. Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop* 1999; 367: S68-83.

2. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230-47.
3. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-4.
4. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105: 1663-8.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
6. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-94.

7. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988; 254: 317-30.
8. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed *in vivo* with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 1991; 12: 253-8.
9. Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, et al. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 122-9.
10. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1996; 32: 481-92.
11. Vacanti CA, Kim W, Upton J, Mooney D, Vacanti JP. The efficacy of periosteal cells compared to chondrocytes in the tissue engineered repair of bone defects. *Tissue Eng* 1995; 1: 301-8.
12. Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 1999; 30: 599-613.
13. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998; 16: 155-62.
14. Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder S. Culture-expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng* 1997; 3: 173-85.
15. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 985-96.
16. Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 959-63.

Hervé Petite

Laboratoire de recherches orthopédiques, UPRESA 7052, Faculté de médecine Lariboisière Saint-Louis, Université Denis-Diderot, 10, avenue de Verdun, 75010 Paris, France.