



**HAL**  
open science

# Validation des propriétés biologiques et structurelles d'allogreffes de tissus de l'appareil locomoteur issues d'un nouveau procédé de traitement.

Guillaume Villatte

► **To cite this version:**

Guillaume Villatte. Validation des propriétés biologiques et structurelles d'allogreffes de tissus de l'appareil locomoteur issues d'un nouveau procédé de traitement.. Chirurgie. Université Clermont Auvergne (UCA), 2022. Français. NNT: . tel-04601922

**HAL Id: tel-04601922**

**<https://hal.science/tel-04601922v1>**

Submitted on 5 Jun 2024

**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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE  
LA SANTE – AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

## THESE

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité : Santé

Par **VILLATTE Guillaume**

Master 2 : Technologie pour la médecine

**TITRE DE LA THESE : Validation des propriétés biologiques et structurelles d'allogreffes de tissus de l'appareil locomoteur issues d'un nouveau procédé de traitement.**

Anglais: Validation of the biological and structural properties of musculoskeletal allografts treated by a new processing method.

Soutenue publiquement le 20 décembre 2022, devant la commission d'examen.

Directeur de Thèse : Pr Stéphane Descamps

Co-directeurs: Dr Yohann Wittrant, Dr Roger Erivan

Président : Pr C. Forestier

Examineurs : Pr N. Bonneville, Pr P-S Marcheix (rapporteurs)

Pr V. Sautou

Pr J-M Nedelec (invité)



# Résumé

---

L'utilisation des allogreffes en orthopédie est très fréquente. Les banques de tissus distribuent ces tissus le plus souvent sous forme congelée ou après traitement physico-chimique. Cette dernière modalité permet une facilité de conservation et de distribution des tissus. Un nouveau procédé de traitement basé sur l'utilisation du Dioxyde de Carbone supercritique (CO<sub>2</sub>sc) sans aucun ajout de substance chimique a été développé. L'objectif de ce travail était de comparer les propriétés mécaniques, structurelles et biologiques de l'os traité selon ce nouveau traitement versus de l'os conservé selon d'autres modalités reconnues.

Les tests mécaniques ainsi que les analyses histomorphométriques (microscanner) et de surface (MEB) ont permis de constater que l'os nettoyé était globalement plus rigide du fait de la délipidation mais conservait une micro/nano structure proche de celle de l'os congelé.

Les cultures d'ostéoblastes ont montré que l'os traité au CO<sub>2</sub>sc gardait des capacités d'ostéogénèse similaire au gold standard qu'est l'os congelé. Plus intéressant encore, il a été démontré l'impact négatif sur la biocompatibilité des résidus des substances chimiques présents sur les greffons traités par un procédé industriel.

Le traitement au CO<sub>2</sub>sc ne modifie pas significativement les phénomènes d'adhérence et de formation du biofilm de 3 souches bactériennes (*S. aureus* et *epidermidis*, *E. Coli*) sur le tissu par rapport aux autres modes de conservation/traitement habituels.

Le CO<sub>2</sub>sc, qui agit comme un « solvant vert », apparaît donc comme une solution fiable et d'avenir pour le traitement des allogreffes de l'appareil locomoteur. Des travaux similaires sont à envisager sur les allogreffes tendineuses pour valider plus largement ce traitement. De même, des recherches sur les paramètres d'utilisation du CO<sub>2</sub>sc, en jouant aussi sur ses capacités d'imprégnation sont sans doute une voie d'optimisation des allogreffes dans le futur.

Mots clé : allogreffe osseuse, tests mécaniques, histomorphométrie, cultures cellulaires, ostéoblastes, adhérence bactérienne, CO<sub>2</sub> supercritique.

# Résumé (anglais)

---

The use of allografts in orthopedics is very common. Tissue banks usually provide these tissues in deep frozen form or after physico-chemical processing. The latter method enables easy preservation and distribution of tissues. A new treatment process based on the use of supercritical Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>sc) without any addition of chemical substance has been developed. The objective of this work was to compare the mechanical, structural and biological properties of bone treated with this new process versus bone preserved with other recognized modalities.

Mechanical tests as well as histomorphometric (microscanner) and surface (SEM) analyses showed that the cleaned bone was globally stiffer due to delipidation but maintained a micro/nano structure close to that of frozen bone.

The osteoblast cultures revealed that the bone treated with CO<sub>2</sub>sc kept osteogenesis capacities similar to the gold standard which is frozen bone. More interestingly, it was demonstrated the negative impact on biocompatibility of chemical residues present on grafts treated by an industrial process.

The CO<sub>2</sub>sc treatment does not significantly modify the phenomena of adhesion and biofilm formation of 3 bacterial strains (*S. aureus* and *epidermidis*, *E. Coli*) on the tissue compared to the other usual conservation/treatment methods.

The CO<sub>2</sub>sc, which acts as a "green solvent", thus appears to be a reliable and promising solution for the treatment of allografts of the musculoskeletal system. Similar studies are to be considered for tendon allografts in order to validate this treatment more widely. Similarly, research on the parameters of use of CO<sub>2</sub>sc, by also playing on its impregnation capacities, is undoubtedly a way to optimize allografts in the future.

Key words: bone allograft, mechanical testing, histomorphometry, cell culture, osteoblasts, bacterial adhesion, supercritical Carbon Dioxide.

# Remerciements

---

Un immense merci aux 3 têtes pensantes du service pour votre soutien moral et intellectuel qui m'a permis d'achever ce travail. Une vraie équipe.

A Yohann Wittrant. Tu as été la pierre angulaire de ce projet. Tu as su me donner les bonnes directions pour que ce travail aboutisse réellement à quelque chose. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré et la facilité des échanges avec toi. J'espère que nous aurons d'autres projets en commun.

A tous ceux qui ont participé de loin ou de près à ce travail (Ousmane Traoré, Jean-Marie Nedelec, Pierre, Guillaume, Adrien, les chefs de clinique et internes...).

A mes parents, ma sœur, mon frère et leurs familles, car mêmes dans les situations difficiles de ses dernières années vous m'avez toujours suivi et soutenu dans mon cursus sans fin.

A Alice et Hippolyte pour tout le bonheur et l'amour que vous m'apportez au quotidien... et tout le reste...

# Publications issues de la thèse

---

Villatte, G., Erivan, R., Cueff, R., Wittrant, Y., Boisgard, S., & Descamps, S. (2022). Evaluation of the biomechanical and structural properties of bone allografts treated with a new cleaning process. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 14(3), 608-616.

Villatte G, Erivan R, Descamps S, Arque P, Boisgard S, et al. (2022) In vitro osteoblast activity is decreased by residues of chemicals used in the cleaning and viral inactivation process of bone allografts. *PLOS ONE* 17(10): e0275480

## **Soumission à venir**

Etude de l'adhérence et du développement bactérien sur des greffons osseux selon leur modalité de conservation et traitement.

# Validation des propriétés biologiques et structurales d'allogreffes de tissus de l'appareil locomoteur issues d'un nouveau procédé de traitement

## **Tables des matières**

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. Introduction générale, contexte et objectifs.....</b>   | <b>p8</b>  |
| <b>2. Etude des propriétés biomécaniques et structurales des allogreffes traitées.....</b>  | <b>p13</b> |
| Résumé.....   | p13        |
| Introduction.....   | p14        |
| Matériel et méthodes.....   | p15        |
| Résultats.....  | p19        |
| Discussion.....   | p24        |
| Conclusion.....   | p26        |
| Article publié.....   | p28        |
| <b>3. Etude des propriétés biologiques des allogreffes traitées avec des cultures cellulaires eucaryotes (ostéogénèse).....</b>                           | <b>p37</b> |
| Résumé.....   | p37        |
| Introduction.....   | p38        |
| Matériel et méthodes.....   | p39        |
| Résultats.....  | p44        |
| Discussion.....   | p52        |
| Conclusion.....   | p54        |
| Article publié.....   | p57        |
| <b>4. Etude des propriétés biologiques des allogreffes traitées avec des cultures cellulaires procaryotes (adhérence et développement bactérien).....</b> | <b>p68</b> |
| Résumé.....   | p68        |
| Introduction.....   | p69        |
| Matériel et méthodes.....   | p70        |
| Résultats.....  | p73        |
| Discussion.....   | p79        |
| Conclusion.....   | p81        |
| Annexe 1.....   | p84        |
| <b>5. Discussion générale et perspectives.....</b>  | <b>p86</b> |
| <b>6. Conclusion.....</b>   | <b>p90</b> |

## 1. Introduction générale, contexte et objectifs

Les allogreffes tissulaires de l'appareil locomoteur, en particulier osseuses, sont d'utilisation très ancienne. Même si de multiples faits historiques rapportent des équivalents de greffes ostéoarticulaires dès le Moyen-Age, la première allogreffe osseuse est attribuée à Mac Ewen en 1878 en Ecosse pour une cure de pseudarthrose septique. Néanmoins les limites de la médecine de cette période (asepsie, conservation, matériel médical...) vont faire que ces allogreffes sont restées exceptionnelles avant la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle(1).

A partir des années 1980, l'essor de la chirurgie prothétique articulaire et donc des révisions prothétiques, mais aussi de la chirurgie tumorale des membres, couplé à la facilité de conservation des tissus ont fait que l'utilisation des allogreffes osseuses est devenue une pratique courante. Dans les années 2000 aux Etats-Unis, 800 000 allogreffes osseuses étaient réalisées(2) tandis qu'en 2016 en France, l'Agence de Biomédecine rapportait l'utilisation d'environ 53 000 allogreffes osseuses. Malgré le développement des biomatériaux de substitution, les allogreffes restent le substitut osseux le plus utilisé en Europe(3). Des disparités importantes existent cependant entre les pays principalement dues à la disponibilité des tissus et aux habitudes chirurgicales, mais dans tous les cas toutes les études montrent un accroissement de l'utilisation et de la demande(4).

En France, la collecte, la sécurisation, la conservation et la distribution des greffons sont assurées par des Banques de Tissus sous le contrôle de l'Agence de Biomédecine (ABM) et l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), encadrées par une directive Européenne sur les tissus et cellules humaines de 2004(5,6).

Les greffons ont 2 origines possibles. Ce sont soit des résidus opératoires lors de chirurgie prothétique de hanche (tête fémorale de donneur vivant), soit des segments ostéo-cartilagineux ou des tissus mous prélevés lors de Prélèvements Multi-Organes et Tissus (PMOT) ou en post-mortem sur donneurs décédés.

Avant d'être implantable chez un être humain, le greffon va subir un bilan de sécurisation visant à limiter le risque de transmission d'agent pathogène. Il se décompose en 4 phases : - l'analyse des antécédents du donneur (infectieux, neurodégénératifs, cancéreux...), - un bilan biologique du donneur fixé par des textes réglementaires (sérologies virales de l'hépatite B et C (VHB et VHC), de la syphilis, de l'HTLV et du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) au minimum), - un prélèvement bactériologique sur chaque greffon avant son conditionnement

stérile, - et au choix selon les recommandations du GESTO de 1994 : soit immédiatement un bilan de biologie moléculaire complémentaire par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour le VIH et le VHC, soit 4 mois plus tard le même bilan biologique qu'initialement sur le patient donneur, et/ou ultérieurement un traitement complémentaire du greffon.

Ainsi sécurisé, le greffon pourra être conservé, le plus souvent par congélation directe à -80° Celsius (C.). C'est le mode de conservation historique qui reste la référence et pratiqué par toutes les banques de tissus à but non lucratif en France(4). Facilement disponible, ce mode de conservation altère très peu les propriétés mécaniques (environ 1 % d'altération de la contrainte à rupture)(7) et diminue l'immunogénicité(8,9). Certaines banques de tissus préfèrent la cryoconservation à -180°C associée à un cryoconservateur comme le Diméthylsulfoxyde DMSO afin de favoriser la survie cellulaire(10), mais cela complexifie le processus de conservation et surtout la logistique pour la distribution du greffon qui doit respecter la chaîne du froid.

Afin d'optimiser la sécurité microbiologique et de simplifier les conditions de conservation et de distribution (température ambiante), un traitement complémentaire du greffon peut être réalisé après le prélèvement. Il correspond à un processus de nettoyage aboutissant à un os sec pouvant dans certains cas être considéré comme stérilisant. Ce traitement est variable selon les banques de tissus mais repose sur l'association d'un procédé chimique plus ou moins complexe (délipidation et décellularisation par éthanol, solvants ou dénaturants protéiques puissants pour éliminer des Agents Transmissibles Non Conventionnels), puis d'un procédé physique (lavage mécanique avant décellularisation, irradiation gamma ou bêta, chaleur, lyophilisation). Néanmoins ce traitement complémentaire a potentiellement des conséquences néfastes au niveau biocompatibilité, à la fois pour des raisons mécaniques (diminution de la résistance et augmentation de la rigidité, modifications de la microstructure et de la surface) et biologiques (toxicité directe et indirecte sur les ostéoblastes).

Les conservations par le froid et à température ambiante suite à un traitement présentent donc une complémentarité sur le plan biologique et mécanique mais aussi pour la diffusion des allogreffes osseuses.

Dans tous les cas ces allogreffes osseuses en tant que substitut osseux n'ont principalement que des propriétés ostéoconductive. Hormis le collagène, la majeure partie de la phase organique est morte ou inexistante et c'est donc la phase inorganique phosphocalcique qui va servir de structure « à la colonisation cellulaire par les cellules de l'hôte ». L'ossification est centripète, à partir de l'os hôte, ce qui conduit à distinguer en premier lieu la fusion entre greffe et l'os

hôte, généralement acquise, et l'ostéo-intégration proprement dite du greffon, plus inconstante, et qui peut dépendre du type d'os (spongieux ou cortical) et de la technique opératoire utilisée.

L'Ostéobanque est une Banque de Tissus à but non lucratif, créée le 16 mars 1998 (Association loi 1901). Son activité historique était centrée sur les allogreffes obtenues à partir de résidus opératoires de têtes fémorales. La conservation était assurée par une congélation à -80°C ou à température ambiante après un traitement complémentaire comprenant notamment des produits chimiques. Depuis 2016 et le développement d'une équipe mobile de chirurgiens préleveurs, des allogreffes osseuses massives et de tissus mous sont aussi distribuées après prélèvements lors de PMOT. C'est la seule banque de tissus en France proposant à tous les chirurgiens du territoire l'ensemble des tissus de l'appareil locomoteur. Actuellement les greffons issus de PMOT sont uniquement conservés sous forme congelée car aucun traitement complémentaire n'est validé sur ce type de tissus en France.

Le comité scientifique de l'Ostéobanque a donc soumis l'idée de développer un traitement complémentaire qui permettrait de faciliter la logistique de conservation et distribution, mais surtout plus « biocompatible » et conservant les capacités structurelles du tissu frais afin de favoriser l'ostéointégration du greffon par les cellules hôtes. Les prérequis de ce traitement étaient : un nettoyage suffisant permettant d'obtenir un tissu sec conservable à température ambiante et adaptable aux différents types de tissus, une absence d'utilisation de produit chimique potentiellement toxique et une facilité de mise en œuvre.

En collaboration avec l'équipe de recherche « Matériaux pour la Santé » de l'université Clermont Auvergne, un procédé de traitement complémentaire a été développé(11). Il repose sur l'association d'un nettoyage mécanique non agressif (bains à ultra-sons dans du sérum physiologique et centrifugations) puis d'un traitement d'extraction par Dioxyde de Carbone Supercritique (CO<sub>2</sub>sc). L'ensemble du traitement est réalisé à une température inférieure ou égal à 40°C pour ne pas dénaturer la trame collagénique.

L'état supercritique est un état fluide de la matière obtenu après dépassement du point critique spécifique du corps pur (31°C et 74 Bar pour le CO<sub>2</sub>sc). Cet état présente une viscosité proche d'un gaz et une densité proche d'un liquide permettant une diffusivité très élevée. Le CO<sub>2</sub>sc est le fluide supercritique le plus commun du fait de ses propriétés fort intéressantes utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et scientifique depuis 40 ans. Il agit comme un solvant "vert" totalement neutre, non toxique, facile à mettre en œuvre et à bas prix.

Les premiers travaux sur ce sujet(11) ont permis d'obtenir un traitement aboutissant à un os macroscopiquement propre et sec (Fig. 1). D'un point de vue histologique, la délipidation et la décellularisation étaient majeures. Le traitement ne peut cependant pas être qualifié de stérilisant (viro-inactivateur et bactéricide) car il réduit la charge virale de 3,5 Logs et la charge bactérienne de 4 Logs en moyenne (contre 4 et 6 Logs respectivement demandé par les instances réglementaires SAL (Safety Assurance Level)).

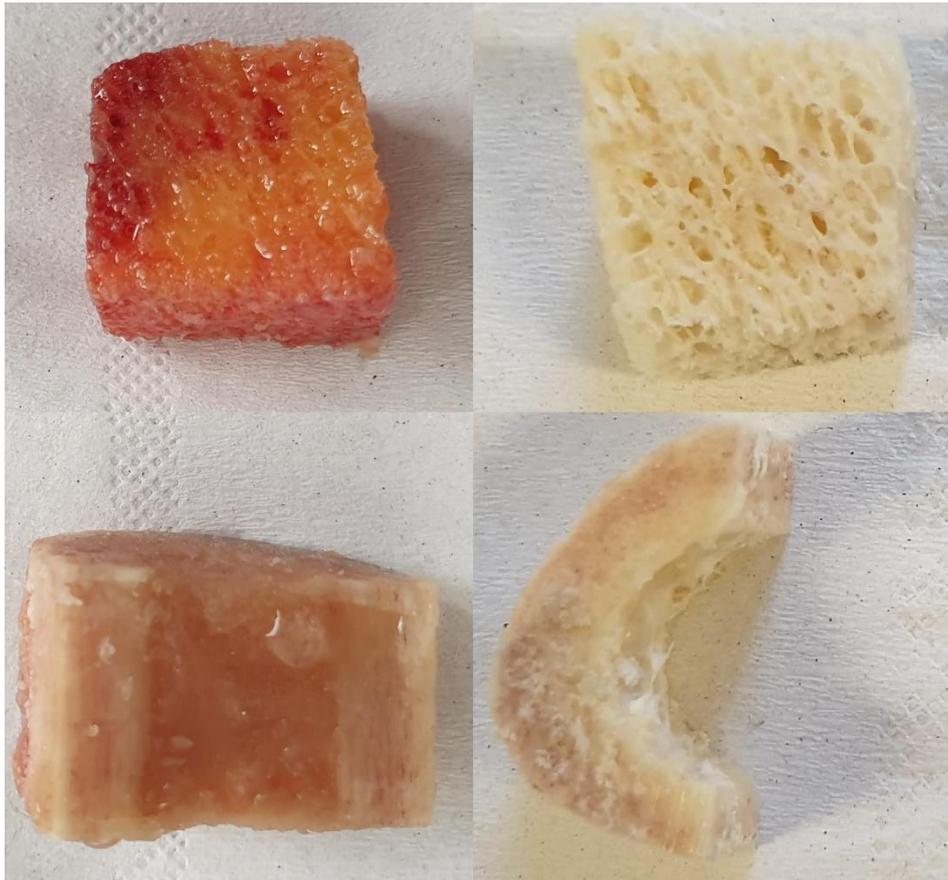


Figure 1 : Os spongieux (en haut) et cortical (en bas) congelés (à gauche) et après nettoyage par traitement au CO<sub>2</sub>sc (à droite).

L'objectif de ce travail était de comparer les propriétés de l'os traité selon ce nouveau traitement complémentaire à base de CO<sub>2</sub>sc (« os CO<sub>2</sub>sc ») versus de l'os conservé selon d'autres modalités reconnues (congelé « os C », traité chimiquement « os CT » ...) en évaluant :

\* les propriétés mécaniques et structurelles :

- par une étude biomécanique.
- par une étude histomorphométrique en microscanner (microCT),
- par une étude d'analyse de surface en Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

\* la propriétés biologiques :

- par une étude sur des cultures cellulaires eucaryotes (ostéogénèse),
- par une étude sur des cultures cellulaires procaryotes (adhérence et développement bactérien).

Chaque section sera présentée sous la forme d'un article indépendant.

### *Références*

1. Vastel L. Allogreffes osseuses et banques de tissus. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-015-A-10, 2010. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/243458/allogreffes-osseuses-et-banques-de-tissus>
2. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br.* mai 2007;89(5):574-9.
3. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2016 [Internet]. Disponible sur: <https://www.agencebiomedecine.fr/annexes/bilan2016/donnees/sommaire-organes.htm>
4. Erivan R, Villatte G, Ollivier M, Descamps S, Boisgard S. Update on the supply and use of allografts in locomotor system pathologies in France. *Orthop Traumatol Surg Res.* nov 2018;104(7):1125-30.
5. Bonnes pratiques - Tissus et Cellules - ANSM [Internet]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/reference/bonnes-pratiques-tissus-et-cellules>
6. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells [Internet]. OJ L mars 31, 2004. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2004/23/oj/eng>
7. Carter DR, Hayes WC. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg Am.* oct 1977;59(7):954-62.
8. Friedlaender GE. Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *J Bone Joint Surg Am.* sept 1991;73(8):1119-22.
9. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* avr 1987;69(4):573-82.
10. Immunologie de l'allogreffe osseuse et ostéo-cartilagineuse – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps [Internet]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/immunologie-de-lallogreffe-osseuse-et-osteo-cartilagineuse/>
11. Erivan R. Evolution, préparation et traitement des allogreffes de l'appareil locomoteur [Internet] [These de doctorat]. Université Clermont Auvergne (2017-2020); 2019. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2019CLFAS007>

## 2. Etude des propriétés biomécaniques et structurelles des allogreffes traitées

### *Résumé*

L'utilisation des allogreffes osseuses est de plus en plus courante. Les propriétés mécaniques et structurelles intrinsèques du greffon sont d'une importance majeure pour l'ostéointégration. Les traitements de nettoyage actuels utilisant des produits chimiques ou physiques permettent d'augmenter la sécurité biologique mais peuvent perturber ces caractéristiques de l'os. Un nouveau traitement de nettoyage, de l'os spongieux et cortical, par lavage mécanique simple (sonication et centrifugation) et traitement au Dioxyde de Carbone Supercritique (CO<sub>2</sub>sc) a été mis au point. L'objectif était de comparer les résultats mécaniques et structurelles des allogreffes nettoyées avec ce traitement versus conservées par congélation à -80°C. Des tests de flexion en 3 points, en compression et de dureté ont été réalisés pour l'analyse biomécanique. Les caractéristiques structurelles des allogreffes ont été évaluées en micro-scanner (histomorphométrie) et en Microscopie Electronique à Balayage (analyse de surface). L'ensemble des données ont permis de constater que l'os nettoyé était globalement plus rigide du fait de la délipidation mais conservait une structure similaire à l'os congelé. On peut donc considérer que l'os nettoyé par ce nouveau traitement conserve des propriétés mécaniques et structurelles proches de l'os congelé.

## *Introduction*

Le tissu osseux est un matériau complexe de par sa structure composite (phase minérale et phase organique) et multi-échelles qui lui confère des propriétés élasto-plastiques et un comportement anisotrope mais aussi des propriétés biologiques. Aussi dans le cas d'une perte de substance osseuse, une allogreffe osseuse va permettre le comblement de la zone et ainsi jouer à la fois un rôle mécanique et un rôle de trame ostéoconductive. Il existe en effet un lien étroit entre propriétés mécaniques et biologiques du greffon ; d'ailleurs sur le moyen/long terme, seule sa bonne ostéointégration sera garante de ses capacités mécaniques.

Les propriétés structurelles intrinsèques du greffon sont donc d'une importance majeure durant les premiers mois suivants la greffe. A l'échelle macroscopique, le greffon (en association avec le moyen d'ostéosynthèse ou prothétique) va devoir résister aux contraintes locales cycliques. Le risque évolutif étant une fracture du greffon par fatigue à court/moyen terme. A l'échelle micro et nanoscopique, les caractéristiques microarchitecturales du greffon vont avoir un impact sur l'ostéointégration et les capacités biomécaniques. On considère généralement que la taille des pores et le taux de porosité favorisent la repousse osseuse mais au détriment des propriétés mécaniques(1,2). La surface spécifique du greffon est aussi probablement primordiale puisqu'il est souvent dit que la repousse osseuse se déroule par épitaxie(3).

Les différents traitements complémentaires existants entraînent des modifications structurelles et biomécaniques des greffons spongieux ou corticaux, en altérant à la fois leurs trames organique et inorganique. A titre d'exemples, l'irradiation gamma (à la dose habituelle de 25 kGy) altère d'environ 20% la résistance en flexion de l'os cortical(4,5) ; le nettoyage mécanique et la lyophilisation entraînent une augmentation du module de Young (rigidification) de l'os spongieux(6) et peuvent détruire des travées osseuses; les produits chimiques (solvant, alcool, détergent, urée, soude, peroxyde d'hydrogène...) altèrent la structure protéique et le collagène fibrillaire, pouvant aboutir dans certains procédés à des baisses de 35% des capacités mécaniques(7).

Dans ce contexte, nous avons développé un nouveau procédé de traitement complémentaire à la fois pour l'os spongieux et cortical n'utilisant aucun produit chimique. Il repose sur l'association d'un nettoyage mécanique non agressif (bains à ultra-sons dans du sérum physiologique et centrifugations) puis un traitement d'extraction par Dioxyde de Carbone Supercritique (CO<sub>2</sub>sc). L'ensemble du traitement étant réalisé à une température inférieure ou égale à 40°C pour ne pas dénaturer la trame collagénique.

L'effet sur les propriétés mécaniques et structurelles du greffon osseux de ce nouveau traitement sans adjonction de produit chimique n'a jamais été évalué.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer les caractéristiques mécaniques et structurelles d'un os traité par ce nouveau procédé (« os CO<sub>2</sub>SC »), versus conservé par congélation (« os C »).

L'hypothèse était qu'il n'y avait pas de différence entre ces 2 types de greffons osseux.

### *Matériel et Méthodes*

#### *Autorisation éthique*

L'ensemble des tissus et cellules d'origine humaine proviennent de la banque de tissus Ostéobanque et du service d'orthopédie et traumatologie du CHU de Clermont-Ferrand qui bénéficient d'une autorisation d'utilisation pour la recherche (DC-2021-4555).

#### *Etude des propriétés biomécaniques par tests mécaniques macroscopiques*

Des essais mécaniques de flexion en 3 points et en compression étaient effectués sur un dispositif de traction-compression/torsion hydraulique MTS 20M, équipé d'une plate-forme de pliage à 3 points (plage de 40 mm) et de plaques de compression (Fig. 1). L'unité est contrôlée par un logiciel de gestion pendant toute la procédure de tests et de traitement des résultats. Un capteur de force de 500 daN était disponible pour ces tests destructifs. La mesure de la déformation a été suivie à partir de l'enregistrement de la traverse (résolution 100 µm). La vitesse de déplacement de la traverse a été réglée pendant les essais à 3 mm/min. Pour faciliter l'analyse des résultats et permettre une comparaison des réponses mécaniques entre différents échantillons, les résultats ont été enregistrés en contraintes et déformations conventionnelles, calculées à partir de la taille apparente des échantillons.

Le test de flexion en 3 points permettait de déterminer une courbe contrainte-déformation, un module d'élasticité de Young (MPa), la contrainte associée au point de rupture (MPa) et la déformation à la rupture (%).

Pour le test en compression, le module apparent (MPa), la contrainte apparente maximale (MPa) et la déformation apparente maximale (%) étaient mesurés.

Ces essais ont été réalisés sur 10 échantillons d'os spongieux et 10 échantillons d'os cortical de fémur provenant de 10 donneurs différents pour chacun des groupes « os C » et « os CO<sub>2</sub>SC ». Pour les essais en flexion, les échantillons avaient une forme de parallélépipède de 60x10x10mm, tandis que pour les essais en compression ils étaient cubiques (10x10x10mm).

Les échantillons du groupe « os C » étaient décongelés selon un protocole similaire à celui utilisé en pratique clinique, c'est-à-dire progressivement en passant par une décongélation à -20°C pendant 6 heures puis à température ambiante dans du serum physiologique pendant 20 minutes.

Un 3<sup>e</sup> test mécanique de dureté de surface était effectué. La dureté Shore A, a été mesurée sur un duromètre Shore équipé d'une tête spécifique. Cet essai a été réalisé sur 75 échantillons (de forme parallélépipède de 20x10x10mm) pour chaque groupe d'os.

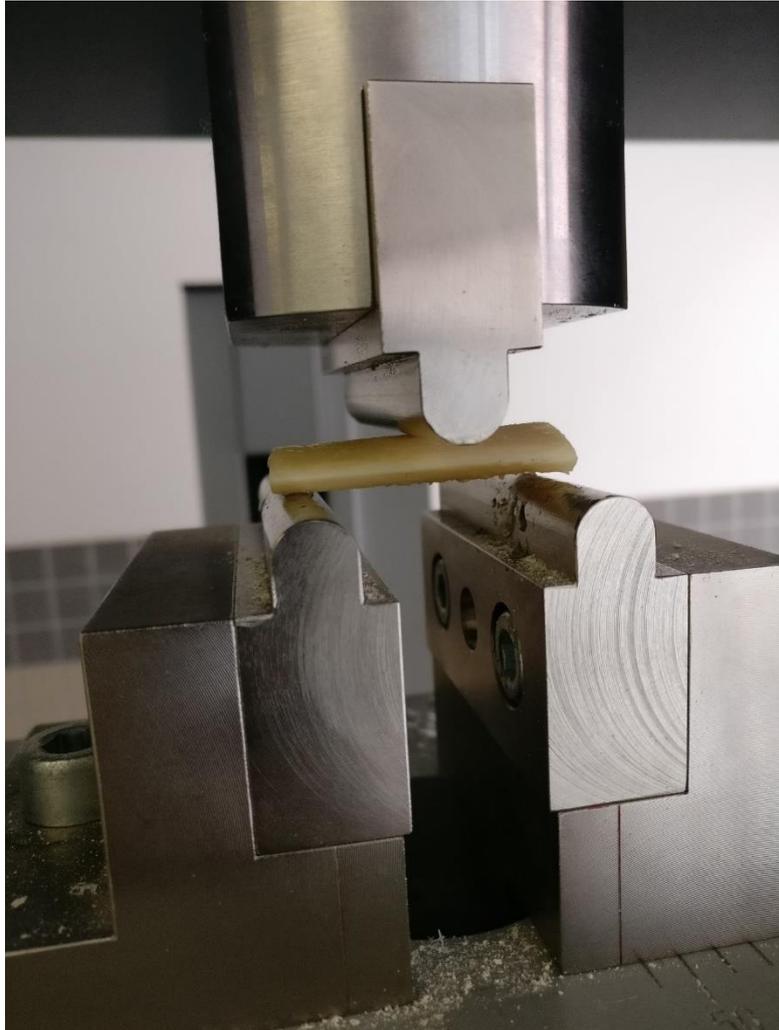


Fig. 1 : Test de flexion en 3 points (dispositif de traction/compression MTS 20M) sur une baguette d'os cortical traitée au CO<sub>2</sub>sc.

### ***Etude des propriétés histomorphométriques en microscanner***

Les analyses ont été réalisées sur un micro-CT pQCT XCT-3000 (Stratec biomed) (Fig. 2), avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health) et le plugin BoneJ. La résolution

maximale du micro-CT est  $137\mu\text{m}$ . La puissance de rayons X est de 12,5W, le voltage du tube de 61,2kV et l'intensité du courant de 0,204mA.

Cinq échantillons (A, B, C, D, E) d'os spongieux (dimensions 10x10x30mm) ont été prélevés sur l'extrémité inférieure du fémur de 5 donneurs différents au cours de PMOT (3 hommes et 2 femmes d'âge moyen  $56\pm 12$  ans). Chaque échantillon était ensuite coupé en 2 (dimensions 10x10x15mm). Un fragment était conservé par congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  (groupe « os C ») et l'autre était nettoyé par le traitement au  $\text{CO}_2\text{sc}$  puis conservé à température ambiante (groupe « os  $\text{CO}_2\text{sc}$  »).

Les mesures étaient effectuées sur 5 coupes successives (espacées chacune de 2mm) pour chaque fragment.

Différentes analyses histomorphométriques ont été effectuées(8):

\* des analyses morphologiques :

- la densité minérale osseuse trabéculaire (DMO) (en  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) ;
- le rapport BV/TV, correspondant au volume d'os minéralisé (BV) sur le volume total (TV) (en %) ;
- l'épaisseur des travées osseuses (Tb.th) (en mm) ;
- l'espace entre les travées osseuses (Tb.sp) (en mm).

\* des analyses topologiques :

- l'anisotropie, correspond à l'organisation directionnelle préférentielle d'un matériau dans l'espace. Une anisotropie égale à 0 signifie qu'il n'y a pas d'orientation particulière des travées. Si elle est égale à 1 cela signifie qu'il y a une orientation spécifique de toutes les travées. ;
- la connectivité, représentant le nombre de connexions entre les travées osseuses.

\* des analyses de texture :

- la dimension fractale est un reflet de la complexité tridimensionnelle micro-architecturale d'une surface ;
- le Structure Model Index (SMI) permet de quantifier la morphologie de la structure selon qu'elle est préférentiellement formée de plaques ou de poutres. Une structure en plaque aura une valeur proche de 0 et une structure en poutre une valeur proche de 3.



Fig. 2 : Os spongieux traité au CO<sub>2</sub>sc, analysé en micro-CT pQCT XCT-3000 (Stratec biomed).

### ***Etude de surface en Microscopie Electronique à Balayage***

Chaque échantillon était fixé, après lavage au PBS, avec du Glutaraldéhyde 1.6% dans du tampon cacodylate de sodium 0.2M pH 7.4 (Delta microscopies) à 4°C. Les images étaient réalisées par le Centre Imagerie Cellulaire Santé (CICS) de la faculté de médecine de Clermont-Ferrand avec un MEB XL 30 (Philips).

L'analyse en MEB avait pour but d'illustrer la microarchitecture et la surface des greffons osseux spongieux des groupes « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc », à 3 échelles différentes (grossissement x30, x100 et x1000). Après une évaluation visuelle subjective de l'aspect de la surface, un comptage manuel du nombre de cavités médullaires de grande et petite tailles

(supérieure ou inférieure à 25 $\mu$ m respectivement) était réalisé 2 fois (à une semaine d'intervalle) pour chaque groupe d'os, sur 5 images à grossissement x100 sélectionnées au hasard.

### ***Statistiques***

Les analyses statistiques étaient réalisées avec le logiciel Excel (Microsoft). Les résultats étaient exprimés à l'aide de moyenne et écart-type (EC), et comparés à l'aide du test de Student. Le seuil de significativité choisi était  $p < 0,05$ .

Pour les analyses histomorphométriques en microscanner, les résultats de chaque paramètre sont présentés sous la forme d'une moyenne et EC globale des 5 coupes de tous les échantillons.

Dans le cas du comptage du nombre de cavités par image au MEB, un coefficient de corrélation entre les 2 séries de comptage a été calculé.

## ***Résultats***

### ***Etude des propriétés biomécaniques par tests mécaniques macroscopiques***

D'un point de vue global, l'os spongieux (Tableau 1) et l'os cortical (Tableau 2) traités au CO<sub>2</sub>sc présentaient un module d'élasticité et une contrainte à rupture plus élevés, mais une déformation plus faible que l'os congelé.

Ces différences étaient significatives uniquement pour les tests en compression pour l'os spongieux, tandis qu'elles étaient significatives uniquement pour les tests en flexion pour l'os cortical.

La dureté était aussi significativement plus élevée pour l'os traité spongieux (+15% environ,  $p = 0,01$ ), mais pas pour l'os cortical.

En d'autres termes, l'os traité était plus rigide, résistant et dur mais moins déformable (donc plus fragile) que l'os congelé.

| <b>Caractérisation mécanique</b> | <b>« Os C »</b> | <b>« Os CO<sub>2</sub>sc »</b> | <b>p-value</b> |
|----------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------|
| <b><u>Flexion 3 points</u></b>   |                 |                                |                |
| Module de Young (MPa)            | 197.7+/-103.3   | 261.3+/-197.9                  | 0,09           |
| Contrainte à la rupture (MPa)    | 6.7+/-4.4       | 9.7+/-4.8                      | 0,11           |
| Déformation à la rupture (%)     | 9.2+/-7.1       | 7.9+/-6.2                      | 0,57           |
| <b><u>Compression</u></b>        |                 |                                |                |
| Module apparent (MPa)            | 114.7+/-69.0    | 354.9+/-261.6                  | <b>0,004</b>   |
| Contrainte max.(app) (MPa)       | 6.1+/-3.5       | 11.2+/-6.8                     | <b>0,01</b>    |
| Déformation max.(app) (%)        | 8.5+/-3.4       | 6.2+/-3.8                      | 0,11           |
| <b><u>Dureté Shore A</u></b>     | 70.5+/-8.8      | 82.6+/-9.0                     | <b>0,01</b>    |

Tableau 1 : Résultats des tests mécaniques sur l'os spongieux.

| <b>Caractérisation mécanique</b> | <b>« Os C »</b>    | <b>« Os CO<sub>2</sub>sc »</b> | <b>p-value</b> |
|----------------------------------|--------------------|--------------------------------|----------------|
| <b><u>Flexion 3 points</u></b>   |                    |                                |                |
| Module de Young (MPa)            | 393.3+/-362.8      | 891.0+/-1174.5                 | <b>0,04</b>    |
| Contrainte à la rupture (MPa)    | 37.6+/-20.5        | 45.9+/-26.6                    | <b>0,02</b>    |
| Déformation à la rupture (%)     | 23.5+/-13.7        | 10.9+/-5.8                     | <b>0,001</b>   |
| <b><u>Compression</u></b>        |                    |                                |                |
| Module apparent (MPa)            | 1517.8+/-<br>809.3 | 1510.3+/-414.4                 | 0,6            |
| Contrainte max.(app) (MPa)       | NA                 | NA                             |                |
| Déformation max.(app) (%)        | NA                 | NA                             |                |
| <b><u>Dureté Shore A</u></b>     | 86.3+/-5.4         | 84.8+/-8.8                     | 0,08           |

Tableau 2 : Résultats des tests mécaniques sur l'os cortical.

### ***Etude des propriétés structurelles en microscanner***

Les résultats de la moyenne des 5 échantillons (moyenne de A+B+C+D+E) sont présentés dans le tableau 3. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les 2 groupes d'os, que ce soit sur les paramètres morphologiques, topologiques ou de texture.

|   | <b>Groupe « Os C »</b> | <b>Groupe « Os CO<sub>2</sub>sc »</b> | <b>p-value</b> |
|---|------------------------|---------------------------------------|----------------|
| <b>Densité trabéculaire (mg/cm<sup>3</sup>)</b> | 143,16 ± 26,79         | 134,92 ± 22,76                        | 0,25           |
| <b>BV/TV (%)</b>                                | 41,25 ± 5,00           | 44,26 ± 8,00                          | 0,15           |
| <b>Tb.th (mm)</b>                               | 0,493 ± 0,16           | 0,502 ± 0,08                          | 0,81           |
| <b>Tb.sp (mm)</b>                               | 0,795 ± 0,35           | 0,795 ± 0,34                          | 0,99           |
| <b>Anisotropie</b>                              | 0,681 ± 0,27           | 0,653 ± 0,31                          | 0,74           |
| <b>Connectivité</b>                             | 674,205 ± 410,69       | 474,245 ± 338,74                      | 0,07           |
| <b>Dimension fractale</b>                       | 2,898 ± 0,32           | 2,913 ± 0,28                          | 0,87           |
| <b>Structure Model Index</b>                    | 3,147 ± 0,79           | 3,347 ± 0,52                          | 0,29           |

Tableau 3 : Résultats moyens des différents paramètres histomorphométriques de l'ensemble des échantillons d'os spongieux.

L'analyse des résultats de chaque échantillon d'os permet d'apporter certains éléments complémentaires :

- aucune différence significative n'a été retrouvée sur les 5 échantillons concernant les paramètres densité trabéculaire et rapport BV/TV ;
- l'épaisseur des travées (Tb.th) était significativement différente pour 3 échantillons. Les travées étaient plus épaisses (+25% environ) dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » pour deux échantillons (p = 0,05), mais étaient plus fines (-30% environ) pour un autre échantillon (p = 0,04). ;
- l'espace inter-trabéculaire (Tb.sp) était significative plus grand (+30% environ) dans le groupe « os C » (p = 0,02) pour un échantillon ;
- la connectivité était très significativement plus faible (-55% environ) dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » (p = 0,001) pour un échantillon ;
- la dimension fractale était significativement plus élevée (+5% environ) dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » pour deux échantillons (p = 0,03 et 0,05 respectivement) ;
- le Structure Model Index était significativement différent pour 3 échantillons. Il était plus faible (-20% environ) dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » pour deux échantillons (p = 0,04 et 0,03 respectivement), alors qu'il était plus élevé (+120% environ) pour un autre échantillon (p = 0,001).

### ***Etude de surface en Microscopie Electronique à Balayage***

A faible et moyen grossissements (Fig. 3 et 4), les images du groupe « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » sont très proches. La structure trabéculaire est respectée. La surface des travées du groupe « os CO<sub>2</sub>sc » semble plus rugueuse (Fig. 3c) et les cavités intertrabéculaires plus « vides » que dans le groupe « os C » (Fig. 4d).

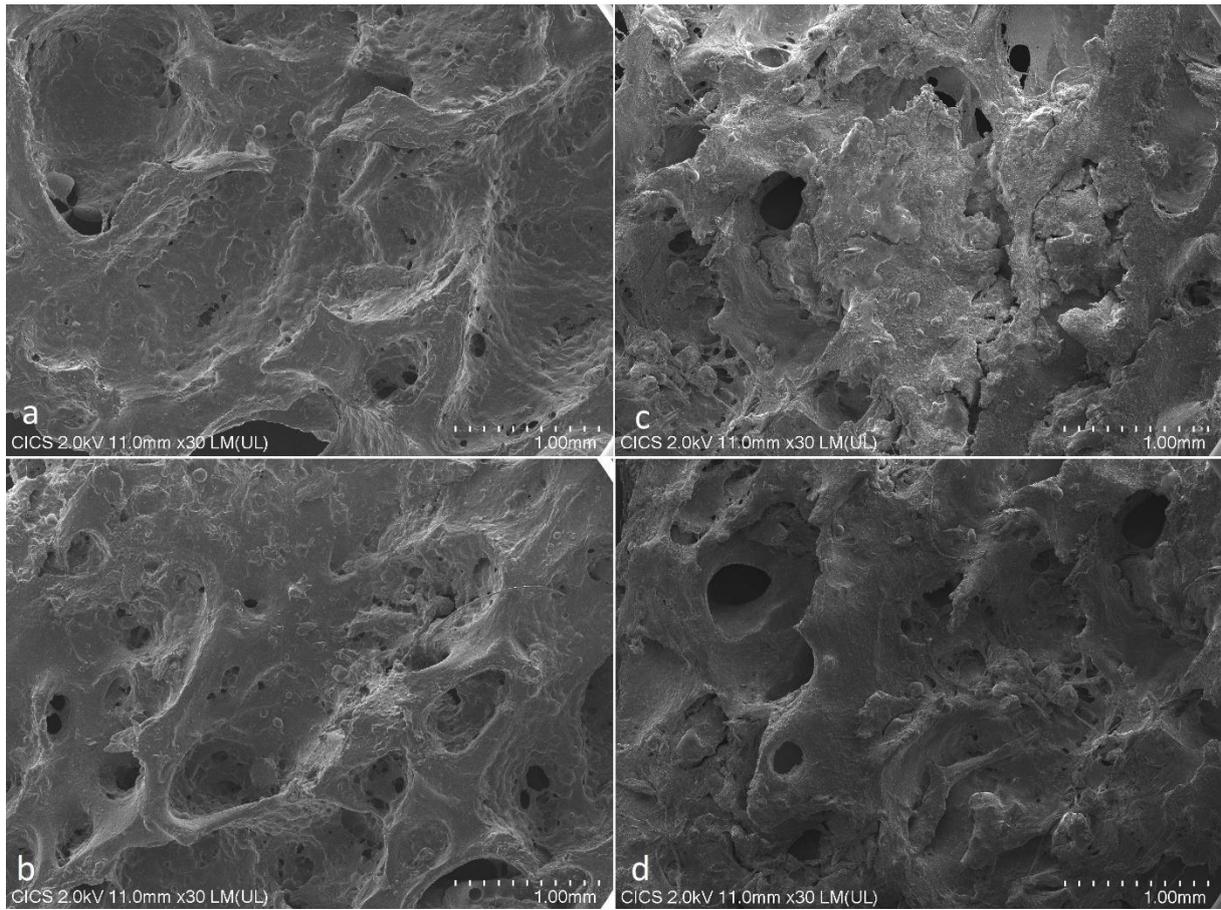


Fig. 3 : Images en MEB à faible grossissement (x30) d'os spongieux des groupes « os C » (a et b) et « os CO<sub>2</sub>sc » (c et d).

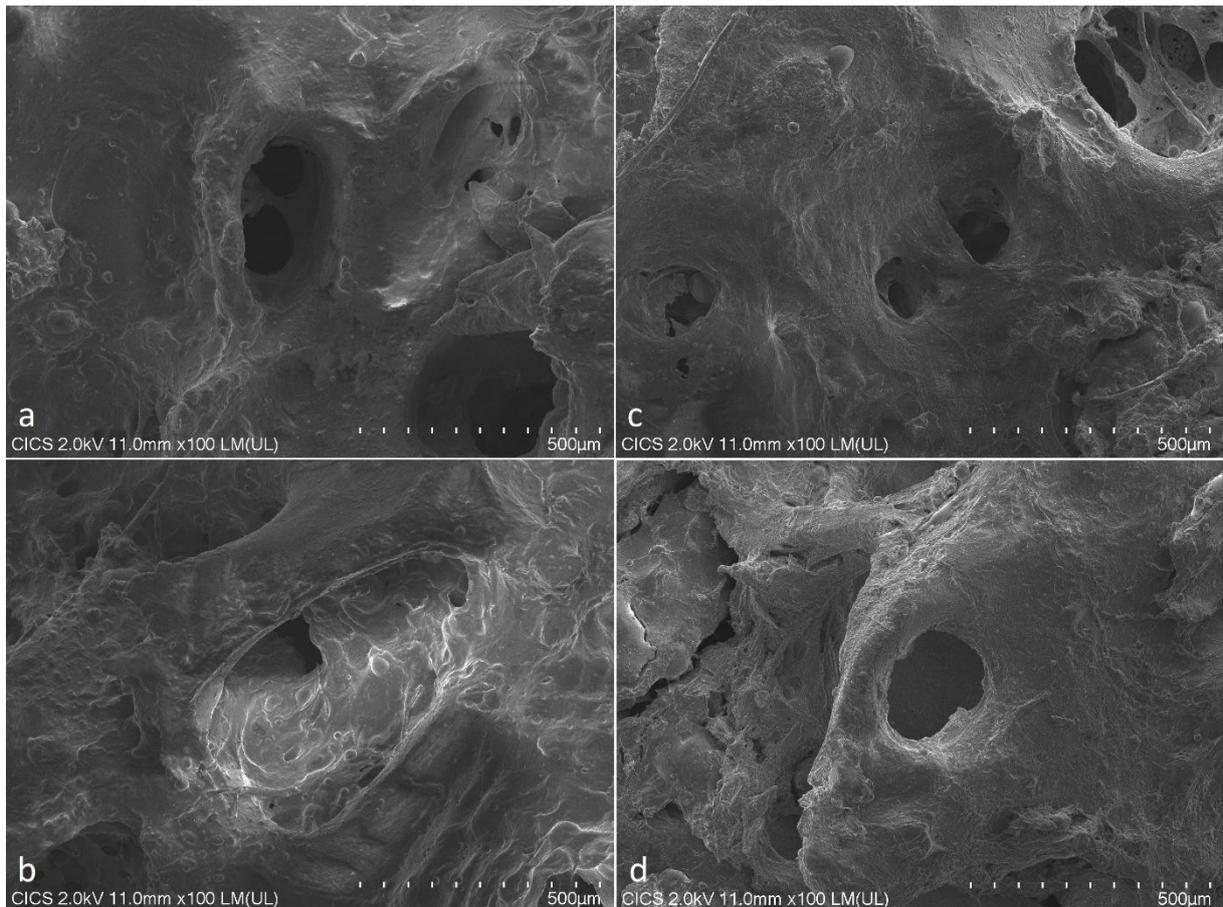


Fig.4 : Images en MEB à moyen grossissement (x100) d'os spongieux des groupes « os C » (a et b) et « os CO<sub>2</sub>sc » (c et d).

A fort grossissement (Fig. 5) l'aspect des 2 groupes d'os apparaît légèrement différent. La surface des « os C » est moins rugueuse que celle des « os CO<sub>2</sub>sc » (Fig. 5 a et b). Dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc », on note un aspect fibrillaire multidirectionnel (Fig. 5c) et plus « rugueux » et « grumelé » (Fig. 5d).

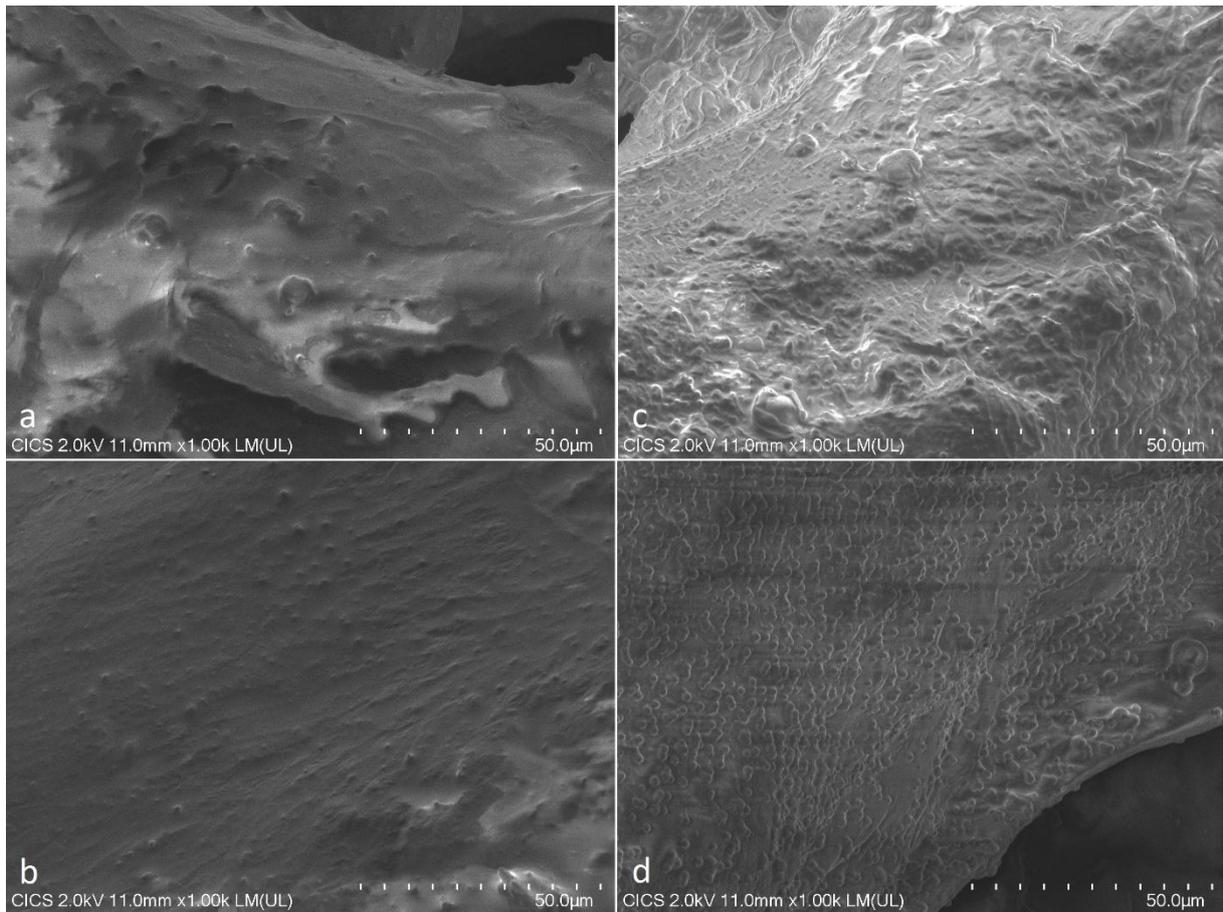


Fig. 5 : Images en MEB à fort grossissement (x1000) d'os spongieux des groupes « os C » (a et b) et « os CO<sub>2</sub>sc » (c et d).

Le coefficient de corrélation des 2 séries de comptage de cavités médullaires par image était bon à 0,81. En moyenne 10,2 $\pm$ 3,3 et 9,1 $\pm$ 3,1 grandes cavités (>25 $\mu$ m) (pour le groupe « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » respectivement) étaient retrouvées par image à un grossissement x100 (p = 0,4). Dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » on dénombrait significativement plus de petites cavités (<25 $\mu$ m) (12,3 $\pm$ 2,3 versus 9,1 $\pm$ 3,1, p = 0,02).

### *Discussion*

Cette étude comparative évalue l'effet d'un traitement par CO<sub>2</sub>sc après lavage mécanique simple (sans adjonction de co-solvant chimique) sur les propriétés mécaniques et structurales de l'os humain versus de la congélation à -80°C. Le maintien des caractéristiques spécifiques de l'os natif est essentiel à la fois pour la reconstruction physique de la perte de substance et pour l'ostéointégration. L'analyse combinée de l'ensemble des paramètres mesurés

permet de confirmer l'hypothèse que ce traitement n'entraîne que de faibles modifications de ces propriétés pour l'os spongieux et cortical.

Les tests mécaniques macroscopiques rapportaient que l'os traité CO<sub>2</sub>sc était plus rigide, résistant et dur mais moins déformable que l'os congelé. Ces différences étaient significatives pour les tests en compression pour l'os spongieux, et pour les tests en flexion 3 points pour l'os cortical. Ces constatations étaient attendues car l'os est un matériau biphasique, composé d'une phase fluide et d'une phase solide, expliquant son comportement viscoélastique, particulièrement pour le tissu spongieux. Le traitement de l'os entraîne une déshydratation et rigidification du fait de la « délipidation » avec un accroissement du module d'élasticité(6,9). Les études mécaniques sur l'os spongieux sont nombreuses et retrouvent des résultats similaires(10–13). Les comparaisons directes des valeurs sont cependant difficiles du fait des écarts types importants dus à la variabilité des os testés (patients et localisations anatomiques différentes). Au contraire, peu de données sont disponibles sur l'effet des procédés de traitement physico-chimique sur l'os cortical (en dehors de l'irradiation et de la lyophilisation) car ils ne sont en général pas validés sur ce type d'os.

Les résultats mécaniques sont supportés par l'analyse histomorphométrique de la structure osseuse qui ne retrouvait aucune différence significative pour l'ensemble des critères entre les 2 groupes d'os. Le traitement de nettoyage n'entraînait donc pas d'altération de la densité osseuse volumique ni de la structure spatiale. Les valeurs moyennes des différents paramètres mesurés correspondaient à celles d'une population adulte non ostéoporotique, ce qui était conforme à notre recrutement(14,15).

L'étude de la surface osseuse en MEB montrait que les cavités médullaires apparaissaient plus « vides » et plus nombreuses (petites cavités inférieures à 25µm) dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » que dans le groupe « os C ». De même à fort grossissement, l'aspect de la surface dans le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » était plus fibrillaire pouvant correspondre à l'organisation collagénique. Ces constatations peuvent être expliquées par l'effet de « nettoyage » du lavage mécanique simple associé au traitement CO<sub>2</sub>sc par rapport à un os cryoconservé. Ceci confirme les données de Rasch et al.(16), qui avait déjà rapporté des résultats similaires sur des traitements chimiques de l'os mais aussi sur l'effet majeur de la sonication sur la décellularisation.

Cette étude présente des limites notamment dues aux variations inter-individuelles des propriétés osseuses. Même si ce biais a été contrôlé en partie grâce à la méthodologie de comparaison directe d'un fragment du groupe « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » provenant du même

patient (et de la même zone anatomique) pour chacune des mesures, on constate de grands écarts-types dans les résultats entraînant une diminution de la puissance de l'étude. Une autre limite concernant les tests mécaniques est que les tests réalisés sont des tests de charges statiques et non cycliques comme celles réellement reçues par un os en réalité. Concernant l'analyse histomorphométrique, une résolution de micro-CT meilleure ( $<100\mu\text{m}$ ) aurait permis d'obtenir une vision plus fine et objective des caractéristiques tridimensionnelles de l'os(15) en complément du MEB. Enfin, les comparaisons ont été effectuées versus de l'os congelé et non frais, car c'est le mode de conservation de référence des allogreffes et que les conséquences mécaniques de cette conservation sont négligeables(17).

### *Conclusion*

L'os humain cortical ou spongieux traité par un nouveau procédé sans aucun solvant chimique conserve des propriétés mécaniques et structurelles proches de l'os congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Des travaux sont désormais nécessaires pour valider les propriétés biologiques, notamment par l'évaluation de la recolonisation osseuse ostéoblastique (prolifération et différenciation).

### *Références*

1. Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. juill 1990;11:86-7.
2. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*. févr 1998;19(1-3):133-9.
3. Chouteau J, Bignon A, Chavassieux P, Chevalier J, Melin M, Fantozzi G, et al. [Cellular culture of osteoblasts and fibroblasts on porous calcium-phosphate bone substitutes]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. févr 2003;89(1):44-52.
4. Nguyen H, Morgan DAF, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(2):93-105.
5. Islam A, Chapin K, Moore E, Ford J, Rinnac C, Akkus O. Gamma Radiation Sterilization Reduces the High-cycle Fatigue Life of Allograft Bone. *Clin Orthop Relat Res*. mars 2016;474(3):827-35.
6. Thorén K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone. Bone conductive and mechanical properties. *Clin Orthop Relat Res*. févr 1995;(311):232-46.
7. Vastel L, Meunier A, Siney H, Sedel L, Courpied JP. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. *Biomaterials*. mai 2004;25(11):2105-10.

8. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* déc 1987;2(6):595-610.
9. Lindahl O. Mechanical properties of dried defatted spongy bone. *Acta Orthop Scand.* févr 1976;47(1):11-9.
10. Mitton D, Rappeneau J, Bardonnat R. Effect of a supercritical CO<sub>2</sub> based treatment on mechanical properties of human cancellous bone. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 1 déc 2005;15(4):264-9.
11. Haimi S, Vienonen A, Hirn M, Pelto M, Virtanen V, Suuronen R. The effect of chemical cleansing procedures combined with peracetic acid-ethanol sterilization on biomechanical properties of cortical bone. *Biologicals.* mars 2008;36(2):99-104.
12. Rauh J, Despang F, Baas J, Liebers C, Pruss A, Gelinsky M, et al. Comparative biomechanical and microstructural analysis of native versus peracetic acid-ethanol treated cancellous bone graft. *Biomed Res Int.* 2014;2014:784702.
13. Erivan R, Villatte G, Cueff R, Boisgard S, Descamps S. Rehydration improves the ductility of dry bone allografts. *Cell Tissue Bank.* sept 2017;18(3):307-12.
14. Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone.* juill 1998;23(1):59-66.
15. Chappard C. [Microarchitecture assessment of human trabecular bone: description of methods]. *Med Sci (Paris).* déc 2012;28(12):1111-5.
16. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLOS ONE.* 20 juin 2019;14(6):e0218404.
17. Carter DR, Hayes WC. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg Am.* oct 1977;59(7):954-62.



(RESEARCH ARTICLE)



## Evaluation of the biomechanical and structural properties of bone allografts treated with a new cleaning process

Guillaume Villatte <sup>1, 2, \*</sup>, Roger Erivan <sup>1, 2</sup>, Regis Cueff <sup>1</sup>, Yohann Wittrant <sup>3</sup>, Stéphane Boisgard <sup>1, 2</sup> and Stéphane Descamps <sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> University of Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup> Orthopedics and Traumatology Department. CHU Montpied Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>3</sup> INRA, University of Clermont Auvergne, UMR 1019 Human Nutrition, CRNH Auvergne, 63000, Clermont-Ferrand, France.

World Journal of Advanced Research and Reviews, 2022, 14(03), 608–616

Publication history: Received on 20 May 2022; revised on 23 June 2022; accepted on 25 June 2022

Article DOI: <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.14.3.0614>

### Abstract

The use of allograft bone is becoming increasingly common. The intrinsic mechanical and structural properties of the graft are of major importance for osseointegration. Current cleaning treatments using chemical or physical products increase biosafety but may disturb these bone characteristics. A new cleaning treatment for cancellous and cortical bone by simple mechanical washing (sonication and centrifugation) and supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) treatment was developed. The mechanical and structural properties of allografts cleaned with this treatment were compared with those obtained after preservation by freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Three-point bending, compression and hardness tests were performed for biomechanical analysis. The structural characteristics of the allografts were evaluated by microscanner (histomorphometry) and scanning electron microscopy (surface analysis). All the data showed that the cleaned bone was generally stiffer owing to delipidation but its structure remained similar to that of the frozen bone. Bone cleaned by this new treatment thus displayed mechanical and structural properties close to those of frozen bone.

**Keywords:** Bone allograft; Cleaning process; Supercritical carbon dioxide; Mechanical analysis.

### 1. Introduction

Bone tissue is a complex material owing to its composite (mineral and organic phases) and multi-scale structure, which give its elasto-plastic properties and anisotropic behavior, together with biological properties. When bone substance is lost, a bone allograft can be used to restore it. Such a graft plays both mechanical and osteoconductive roles. The mechanical and biological properties of a graft are closely linked. In the medium-to-long term, only its successful osseointegration will guarantee mechanical performance.

The intrinsic structural properties of a graft are of major importance during the first few months after grafting. On a macroscopic scale, the graft (in association with the osteosynthesis or prosthesis) will have to withstand cyclic local stresses. There is risk of graft fracture by fatigue in the short-to-medium term. At the micro- and nanoscopic scales, the microarchitectural characteristics of the graft will affect osseointegration and biomechanical capacities. It is generally considered that larger pore size and pore density promote bone regrowth but to the detriment of mechanical properties [1,2]. The specific surface area of the graft is also probably of prime importance, as bone regrowth is said to occur by epitaxy [3].

\* Corresponding author: Guillaume Villatte

University of Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Copyright © 2022 Author(s) retain the copyright of this article. This article is published under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0.

### 3. Etude des propriétés biologiques des allogreffes traitées avec des cultures cellulaires eucaryotes (ostéogénèse)

#### *Résumé*

Introduction : Les allogreffes tissulaires osseuses sont d'utilisation ancienne. Deux grands modes de conservation des allogreffes existent : par le froid (congélation), ou à température ambiante après un traitement complémentaire de nettoyage utilisant des substances chimiques. Ces substances sont considérées comme potentiellement nocives pour l'être humain.

Les objectifs de l'étude étaient de rechercher la présence de résidus de substances chimiques sur une allogreffe osseuse traitée, et de comparer leur biocompatibilité *in vitro* avec des allogreffes congelées.

Matériels et Méthodes : L'évaluation de la présence de résidus de substance chimique a été réalisée par méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC après extraction sur un os traité chimiquement industriellement. L'analyse de la biocompatibilité a été faite à partir de cultures d'ostéoblastes primaires de rats Wistar cultivés sur des disques d'os congelés (groupe « os F »), ou traités avec du dioxyde de carbone supercritique sans adjonction d'aucune substance chimique (groupe « os CO<sub>2</sub>sc »), ou traités industriellement avec des substances chimiques (groupe « os CT »). Une mesure de viabilité cellulaire (XTT) était faite après une semaine de culture. La différenciation ostéoblastique était évaluée après 1, 7 et 14 jours de culture par mesure de l'activité Phosphatase alcaline (ALP) directement sur les disques d'os et indirectement sur le tapis cellulaire au voisinage des disques d'os.

Résultats : Des résidus de toutes les substances chimiques utilisées ont été retrouvés sur « l'os CT ». Il n'y avait de différence significative de viabilité cellulaire entre les 3 groupes d'os. Les activités ALP directe et indirecte étaient significativement plus faibles (-40 à -80%) pour le groupe « os CT » après 7 et 14 jours de cultures ( $p < 0,05$ ).

Conclusion : Les résidus des substances chimiques utilisées lors du procédé de nettoyage des allogreffes osseuses entraîne une diminution de leur biocompatibilité *in vitro*. Les procédés de nettoyage des tissus doivent évoluer en limitant ou remplaçant ces substances chimiques afin de favoriser la biocompatibilité.

## *Introduction*

L'autogreffe osseuse, malgré ses capacités d'ostéoconduction et d'ostéoinduction, présente des limites évidentes à son utilisation (faible disponibilité et morbidité du site de prélèvement), qui font que la recherche sur les substituts de l'os a toujours été active. De nombreuses possibilités ont été développées mais les substituts d'origine osseuse humaine (allogreffes) restent une des solutions privilégiées(1). Dans un but de sécurisation (inactivation des pathogènes transmissibles potentiels) et afin de faciliter les conditions de conservation et la distribution, des traitements complémentaires ont été développés.

Un traitement complémentaire doit idéalement, en plus d'assurer une décellularisation complète, conserver les propriétés mécaniques initiales et surtout assurer un haut degré de biocompatibilité avec les cellules colonisatrices *in situ*, assurant la régénération osseuse(2).

Les traitements actuellement présents sur le marché utilisent tous des substances chimiques tels que l'acétone, l'urée, l'éthanol, la soude, le peroxyde d'hydrogène ou des détergents hyperosmolaires. Erivan et al.(3) a démontré que des traces significatives des différents produits chimiques utilisés lors d'un traitement complémentaire industriel étaient retrouvées à la surface de l'os traité. A titre d'exemple, au minimum 0.625 g d'acétone, 14.03g d'éthanol et 21.25 mg d'urée étaient retrouvés par kilogramme d'os. On peut donc facilement émettre l'idée que ce type de traitement peut vraisemblablement être optimisé d'un point de vue biocompatibilité(4), mais aucune des banques de tissus n'a étudié spécifiquement cette problématique.

Les études histologiques d'évaluation de l'ostéointégration chez l'homme sont rares et difficiles à interpréter car dépendant aussi de l'indication thérapeutique et de la technique chirurgicale. Chaque banque de tissus ayant un traitement complémentaire a validé l'ostéointégration de ses greffons à partir d'études cliniques et radiologiques. Cependant, l'ostéointégration des allogreffes est en général partielle avec des zones revascularisées qui vont « s'intégrer » et d'autres non(4). Les analyses de biocompatibilité *in vivo* chez l'humain ou l'animal sont difficiles à mettre en œuvre et sujettes à de multiples biais. Ainsi, le moyen le plus simple et reproductible pour s'assurer de la biocompatibilité de ces greffons passe par des études *in vitro*.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la biocompatibilité *in vitro* de l'os traité par CO<sub>2</sub>sc avec des ostéoblastes versus de l'os congelé. L'hypothèse était que la biocompatibilité des 2 types d'os était équivalente.

L'objectif secondaire était d'évaluer la biocompatibilité *in vitro* d'un os traité industriellement comprenant des étapes avec des substances chimiques.

### *Matériel et Méthodes*

#### ***Autorisation éthique***

L'ensemble des tissus d'origine humaine provient de la banque de tissus Ostéobanque et du service d'orthopédie et traumatologie du CHU de Clermont-Ferrand qui bénéficient d'une autorisation d'utilisation pour la recherche (DC-2021-4555). Concernant les cellules de rats Wistar, elles ont été obtenues post-mortem dans au sein de l'animalerie de l'INRAE de Clermont-Ferrand (IEN-UNH-UMR1019 / accréditation n°E-6334515).

#### ***Origine et conservation des allogreffes osseuses***

L'ensemble des tissus osseux (spongieux et cortical) provenait de fémur obtenu lors de 4 Prélèvements Multi-Organes et Tissus (PMOT) et donneurs vivants.

Des fragments d'os cortical étaient découpés sous la forme de disque de 10mm de diamètre et de 3mm d'épaisseur. Ils étaient ensuite répartis en 3 groupes selon leur mode de conservation :

- congélation directe à -80°C sans adjonction de conservateur (groupe « os C ») ;
- à température ambiante, après un traitement complémentaire associant un lavage mécanique au serum physiologique puis avec du dioxyde de carbone supercritique (scCO<sub>2</sub>) sans adjonction d'aucune substance chimique (groupe « os CO<sub>2</sub>sc ») ;
- à température ambiante, après un traitement complémentaire industriel associant un lavage mécanique avec de l'eau et un détergent contenant de l'hydroxyde de sodium NaOH, de l'hypochlorite de sodium NaClO et du pyrophosphate du tetrapotassium K<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub>, puis des bains successifs de divers substances chimiques (propanone C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, urée CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), avant une déshydratation par de l'éthanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH et un séchage thermique (groupe os « CT »).

Avant la mise en contact avec les cultures cellulaires, la stérilité des fragments était assurée par un bain dans de l'éthanol à 70% pendant 5 minutes suivi de 3 rinçages successif par une solution de PBS (Gibco), puis séchage à température ambiante sous hotte aspirante.

## ***Cultures cellulaires in vitro***

### ***Type cellulaire***

Des cellules ostéoblastiques primaires de rat ont été isolées par voie enzymatique à partir d'explants obtenus à partir de crâne fœtal de rat Wistar, comme décrit précédemment(5–7). Des morceaux d'os ont été digérés séquentiellement dans une solution de  $\alpha$ -MEM, 1% de pénicilline/streptomycine (p/s), collagénase IA (0,1%), dispase II (0,2%) à 37°C et incubés 15 minutes 4 fois à 37°C. Les cellules de crâne de rat obtenues ont été regroupées etensemencées à une densité initiale de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu  $\alpha$ -MEM additionné de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et de 1 % de p/s en atmosphère contrôlée (5 % CO<sub>2</sub> / 95 % air, 90 % hygrométrie et 37°C) jusqu'à confluence pour repiquage ou congélation.

### ***Mise en culture des ostéoblastes sur les 3 groupes d'os***

Chaque disque d'os était placé dans un puit de plaque de culture (plaque 12 puits (Falcon)), etensemencé avec 35 000 ostéoblastes (10 000 cellules /cm<sup>2</sup>). Deux millilitres de milieu de culture recouvraient l'ensemble. Les plaques étaient ensuite placées en étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, sans agitation. Le milieu de culture était changé 3 fois par semaine avec quantification au bout d'une semaine.

### ***Evaluation quantitative de la viabilité cellulaire par méthode XTT***

Le principe du XTT est de mesurer la viabilité des cellules sur la base de l'activité de leurs enzymes mitochondriales, qui réduisent le XTT (oxydoréduction du tétrazolium). Cette activité est perdue à la mort des cellules.

Après une semaine de mise en culture, les mesures ont été réalisées à l'aide d'un kit Cell Prolifération Kit II XTT (Roche), avec une lecture en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 490 nm.

Les résultats sont présentés en pourcentage, en prenant comme référence (100%) le résultat du groupe « os C ».

L'expérience a été réalisée en douze exemplaires pour les 3 groupes d'os.

### ***Evaluation de la différenciation ostéoblastique et de l'activité de minéralisation par dosage de l'activité Alcaline Phosphatase (ALP)***

L'ALP est considéré comme un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique. Le principe du test repose sur un dosage enzymatique. Les cellules sont lysées et mises en

présence de tampon Buffer avec du pNPP (p-nitrophényl phosphate) qui sera hydrolysé en paranitrophénol et en phosphate en présence de phosphatase alcaline.

Les mesures d'ALP ont été réalisées à l'aide d'un kit Alkaline Phosphatase Diethanolamine Detection (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules étaient détachées des disques avec 400 µL de tampon d'extraction et de lyse RIPA (Thermo Scientific) et centrifugées à 13 000G pendant 10 minutes à 4°C. La densité optique était mesurée par spectrophotométrie à 405nm toutes les 3minutes.

En parallèle et suivant le même protocole de préparation des cellules, un dosage colorimétrique des protéines totales était réalisé par BCA à l'aide d'un kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (Sigma-Aldrich). Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique qui, en présence de protéines, réagit avec le cuivre formant un complexe pourpre. Une gamme étalon a été réalisée à l'aide de sérum bovin albumin (Interchim - UP 36859A). La lecture se fait également par spectrophotométrie à 562 nm.

Le rapport activité ALP / quantité de protéines totale (BCA) permet ainsi d'obtenir l'activité ALP spécifique.

Les résultats étaient présentés en pourcentage, en prenant comme référence (100%) le résultat du groupe « os C ».

L'expérience a été réalisée en douze exemplaires, pour les 3 groupes d'os, après un jour, 7 jours et 14 jours de mise en culture. L'analyse était faite successivement sur le disque d'os (effet direct) puis sur le tapis cellulaire au voisinage du disque d'os (effet indirect) afin d'évaluer l'effet du relargage potentiel de résidus chimiques dans le milieu.

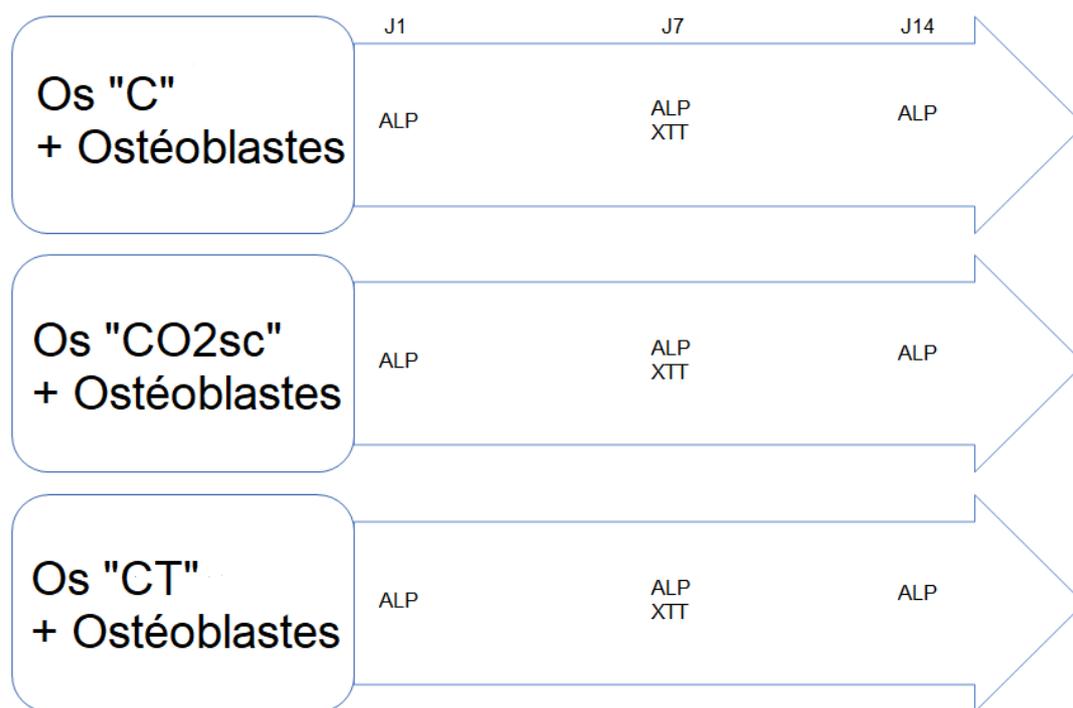


Fig. 1 : Diagramme du plan d'expérimentation des cultures d'ostéoblastes (OB) sur les disques d'os (ALP : évaluation de la différenciation ostéoblastique et de l'activité de minéralisation par dosage de l'activité Alcaline Phosphatase ; XTT : évaluation quantitative de la viabilité cellulaire par méthode XTT (oxydoréduction du tétrazolium) ; J : jour).

### ***Préparation des milieux conditionnés et mise en culture des cellules ostéoblastes primaires de rat***

Trois milieux de culture conditionnés étaient réalisés à partir des 3 différents groupes d'os (os « C », « CO<sub>2</sub>sc » et « CT »). Dix grammes d'os spongieux (de chaque type d'os) broyé finement étaient mis en trempage dans 20ml de milieu de culture  $\alpha$ -MEM additionné de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et de 1 % de p/s pendant 48 heures.

Trente-cinq milles ostéoblastes primaires (10 000 cellules /cm<sup>2</sup>) étaientensemencés par puits de plaque 12 puits équipés d'une membrane avec une taille de pores de 8  $\mu$ m (Falcon), recouverts de 2 mL de milieu de culture. Les plaques étaient placées en étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, sans agitation. Après 48 heures de culture, le milieu de culture était retiré.

Deux millilitres de milieu de culture conditionné provenant soit du groupe « os C », soit « os CO<sub>2</sub>sc » soit « os CT » étaient ensuite déposés dans les puits contenant les ostéoblastes. Un contrôle avec du milieu de culture standard était réalisé en parallèle. Les plaques étaient ensuite à nouveau placées en étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, sans agitation. Le milieu de culture conditionné était changé 3 fois par semaine.

L'évaluation de la viabilité cellulaire (XTT) était faite après 7 jours de culture. L'évaluation de la différenciation ostéoblastique (ALP) était faite après 3 et 7 jours de culture. Les expériences ont été réalisées en triplicat avec un contrôle dans chaque cas.

### ***Evaluation de l'adhésion cellulaire par Microscopie Electronique à Balayage***

Le but de l'analyse en MEB est d'évaluer la morphologie des ostéoblastes au contact des surfaces osseuses.

L'analyse en MEB était réalisée après 4 jours de culture avec des ostéoblastes de rats. Deux échantillons de chaque groupe d'os étaient fixés, après lavage au PBS, avec du Glutaraldéhyde 1.6% dans du tampon cacodylate de sodium 0.2M pH 7.4 (Delta microscopies) à 4°C. Les images étaient réalisées par le Centre Imagerie Cellulaire Santé (CICS) de la faculté de médecine de Clermont-Ferrand avec un MEB XL 30 (Philips).

### ***Expériences complémentaires avec des ostéoblastes humains***

Des cultures d'ostéoblastes humains ont été réalisées sur les 2 groupes d'os « C », « scCO<sub>2</sub> » dans les mêmes conditions expérimentales que les ostéoblastes primaires de rats. Les ostéoblastes humains étaient isolés à partir de moelle osseuse de têtes fémorales issues de résidus opératoires (Sigma-Aldrich).

L'évaluation quantitative de la viabilité cellulaire par méthode XTT a été réalisée en six exemplaires, après 7 jours de culture.

L'évaluation de la différenciation ostéoblastique et de l'activité de minéralisation par dosage de l'activité Alcaline Phosphatase (ALP) a été réalisée en six exemplaires, après un jour, 7 jours et 14 jours de mise en culture. L'analyse était faite successivement sur le disque d'os (effet direct) puis sur le tapis cellulaire au voisinage du disque d'os (effet indirect) afin d'évaluer l'effet du relargage potentiel de résidus chimiques dans le milieu.

### ***Statistiques***

Les analyses statistiques étaient réalisées avec le logiciel Excel (Microsoft). Les résultats étaient exprimés à l'aide de moyenne et écart-type (EC). La normalité de la distribution a été vérifiée par test de Shapiro & Wilk puis la significativité des différences de moyenne a été testée par test de student en cas de normalité sinon par test non paramétrique de Wilcoxon. Le seuil de significativité choisi était  $p < 0,05$ .

## Résultats

### ***Evaluation quantitative de la viabilité cellulaire par méthode XTT***

Après une semaine de mise en culture, il n'y avait pas de différence significative de viabilité cellulaire des ostéoblastes entre les différents groupes d'os (« os C » = 100% (EC 23,3), « os CO<sub>2</sub>sc » = 99,4% (EC 27,7) et « os CT » = 112,6% (EC 77,7),  $p > 0,1$ ) (Fig. 2).

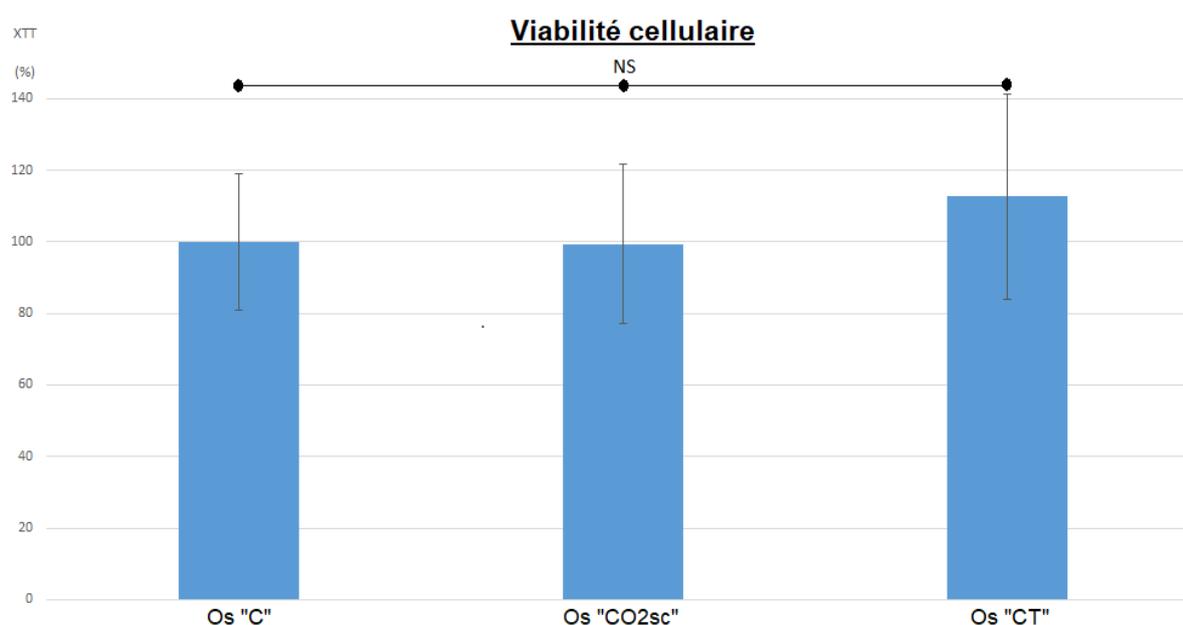


Figure 2 : Viabilité cellulaire moyenne des ostéoblastes après une semaine de culture sur les 3 groupes d'os (exprimée en pourcentage, le groupe « os C » étant la référence 100% ; NS : non significatif).

### ***Evaluation de la différenciation ostéoblastique et minéralisation par méthode ALP***

\* Evaluation de l'activité ALP sur le disque d'os (effet direct) (Fig. 3)

Les activités ALP des disques des 3 groupes ne présentaient pas de différence significative (« os C » = 100% (EC 15,4 ; « os CO<sub>2</sub>sc » = 85,3% (EC 3,9) et « os CT » = 90,7% (EC 3,8),  $p = 0,93$ ) après un jour de culture.

Après 7 jours de mise en culture, il n'y avait toujours pas de différence d'activité ALP des disques entre les 3 groupes d'os, même si dans le groupe « os CT » la baisse d'activité ALP était plus importante (« os C » = 100% (EC 6,6), « os CO<sub>2</sub>sc » = 86,6% (EC 4,3) ( $p = 0,35$ ), et « os CT » = 59,8% (EC 3,3), ( $p = 0,06$ ).

Après 14 jours de mise en culture, l'activité ALP des disques des groupes « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » ne présentaient pas de différence significative (« os C » = 100% (EC 15,6), « os

CO<sub>2</sub>sc » = 73,3% (EC 21,7) p = 0,17). L'activité ALP des disques du groupe « os CT » était significativement inférieure à 30,4% (EC 8,1), p = 0,01).

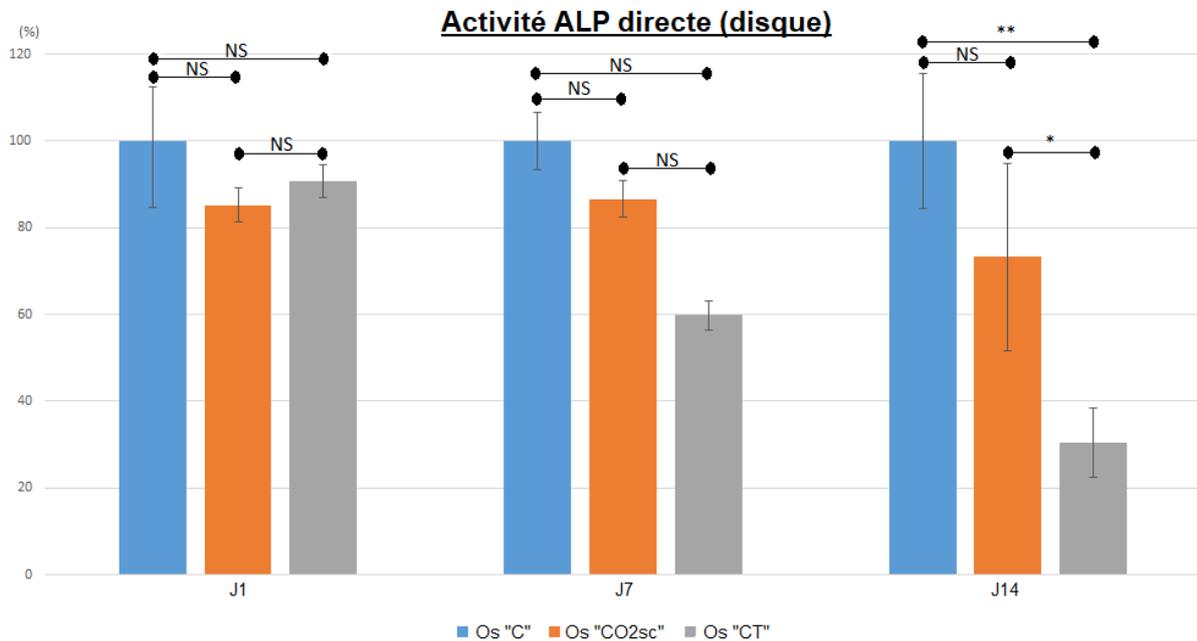


Figure 3 : Activité Alcaline Phosphatase (ALP) des disques d'os (directe) après 1, 7 et 14 jours de culture (exprimée en pourcentage, le groupe « os C » étant la référence 100%) (NS : non significatif ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01).

\* Evaluation de l'activité ALP sur le tapis cellulaire au voisinage du disque d'os (effet indirect) (Fig. 4)

Après un jour de mise en culture, l'activité ALP des tapis cellulaires des groupes « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » ne présentaient pas de différence significative (« os C » = 100% (EC 11,2), « os CO<sub>2</sub>sc » = 84,2% (EC 16,3) p = 0,09). L'activité ALP des tapis du groupe « os CT » était significativement plus faible à 71,9% (EC 16,8) (p = 0,04) que celle du groupe « os C » (mais pas du groupe « os CO<sub>2</sub>sc » (p = 0,23)).

Après 7 jours de mise en culture, l'activité ALP des tapis cellulaires des groupes « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » ne présentaient pas de différence significative (« os C » = 100% (EC 13,8), « os CO<sub>2</sub>sc » = 92,2% (EC 7,0) p = 0,72). L'activité ALP des tapis du groupe « os CT » était significativement plus faible à 31,7% (EC 25,7) que celle des groupes « os C » (p = 0,002) et « os CO<sub>2</sub>sc » (p = 0,02).

Après 14 jours de mise en culture, l'activité ALP des tapis cellulaires des groupes « os F » et « os CO<sub>2</sub>sc » ne présentaient pas de différence significative (« os C » = 100% (EC 17,2),

« os CO<sub>2</sub>sc » = 88,7% (EC 10,2) p = 0,27). L'activité ALP des tapis du groupe « os CT » était significativement plus faible à 20,2% (EC 23,1) que celle des groupes « os C » (p = 0,001) et « os CO<sub>2</sub>sc » (p = 0,01).

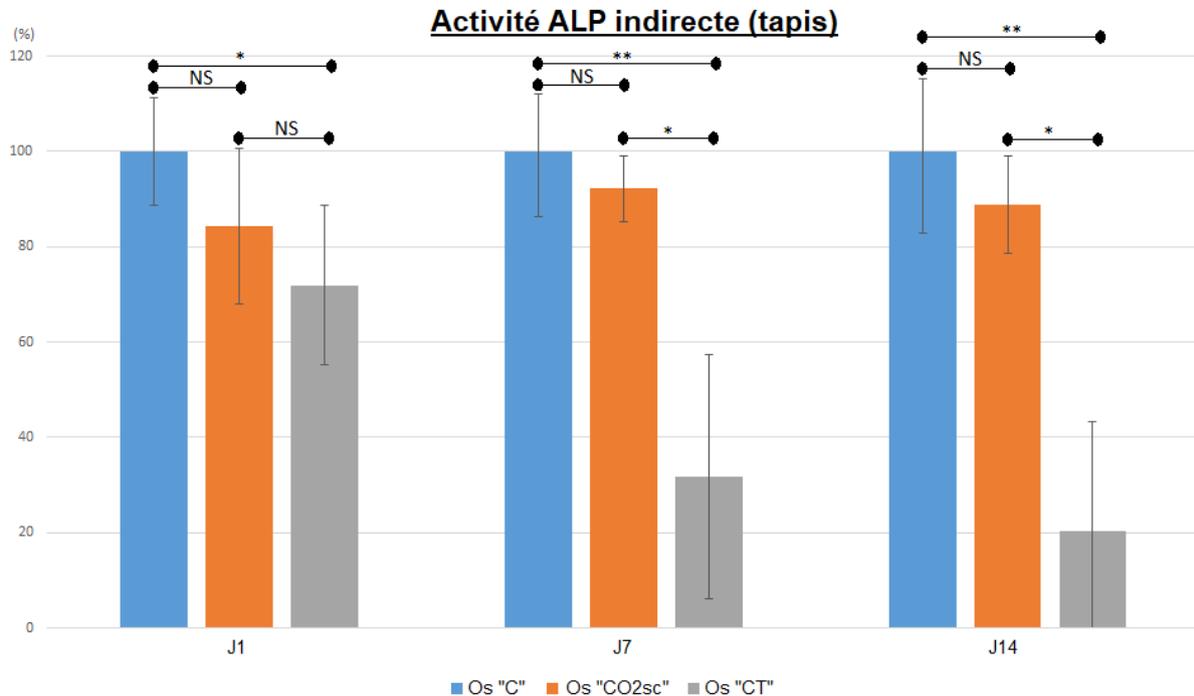


Figure 4 : Activité Alcaline Phosphatase (ALP) des tapis cellulaires au voisinage de disques d'os (indirecte) après 1, 7 et 14 jours de culture (exprimée en pourcentage, le groupe « os C » étant la référence 100%) (NS : non significatif ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01).

### *Evaluation des cultures d'ostéoblastes primaires de rat en milieux de culture conditionnés*

\* Evaluation quantitative de la viabilité cellulaire par méthode XTT (Fig. 5)

Après une semaine de mise en culture, la viabilité cellulaire des groupes « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » ne présentaient pas de différence significative et était comparable au contrôle (« os C » = 100% (EC 21,3), « os CO<sub>2</sub>sc » = 88,7% (EC 29,2) ; p > 0,1). La viabilité dans le groupe « os CT » était significativement plus faible que par rapport aux autres groupes (47,1% (EC 19,4) ; p = 0,03).

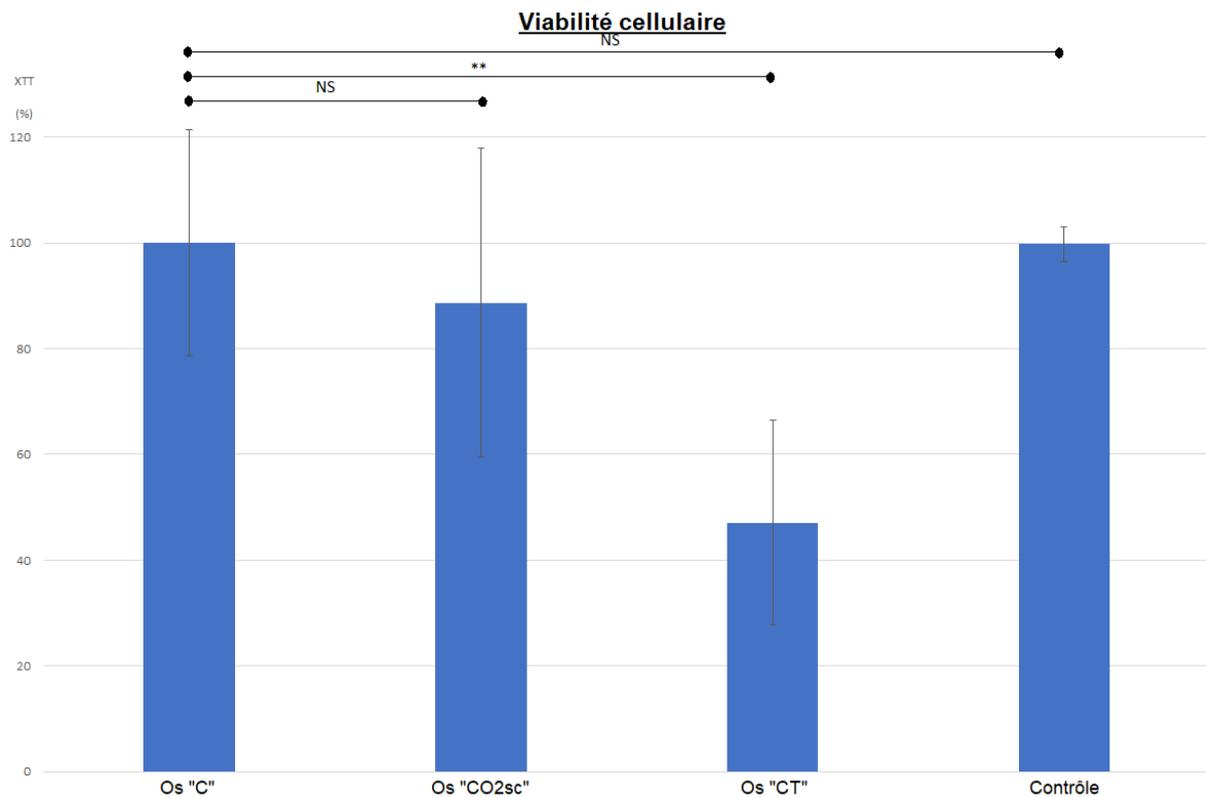


Figure 5 : Viabilité cellulaire moyenne des ostéoblastes après culture en milieux conditionnés (exprimée en pourcentage, le groupe « os C » étant la référence 100%) (NS : non significatif ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ ).

\* Evaluation de la différenciation ostéoblastique et minéralisation par méthode ALP (Fig. 6)

L'activité ALP des 4 groupes était égale à J0. L'activité ALP du groupe contrôle (milieu de culture standard) augmentait significativement à J3 (+250%) puis à J7 (+400%) ( $p < 0,001$ ). L'activité ALP du groupe conditionné « os C » était équivalente entre J0 et J3 (+0%,  $p = 0,33$ ) puis augmentait significativement à J7 (+50%,  $p = 0,02$ ).

L'activité ALP du groupe conditionné « os CO<sub>2</sub>sc » augmentait significativement entre J0 et J3 (+30%,  $p = 0,04$ ) puis diminuait entre J3 et J7 pour redevenir équivalente à celle de J0 (-0%,  $p = 0,45$ ).

L'activité ALP du groupe conditionné « os CT » était significativement diminuée à J3 (-60%) et à J7 (-45%) ( $p = 0,001$ ). L'activité ALP de ce groupe était significativement plus faible que celles des groupes conditionnés « os C » et « os CO<sub>2</sub>sc » ( $p < 0,01$ ) à chaque temps.

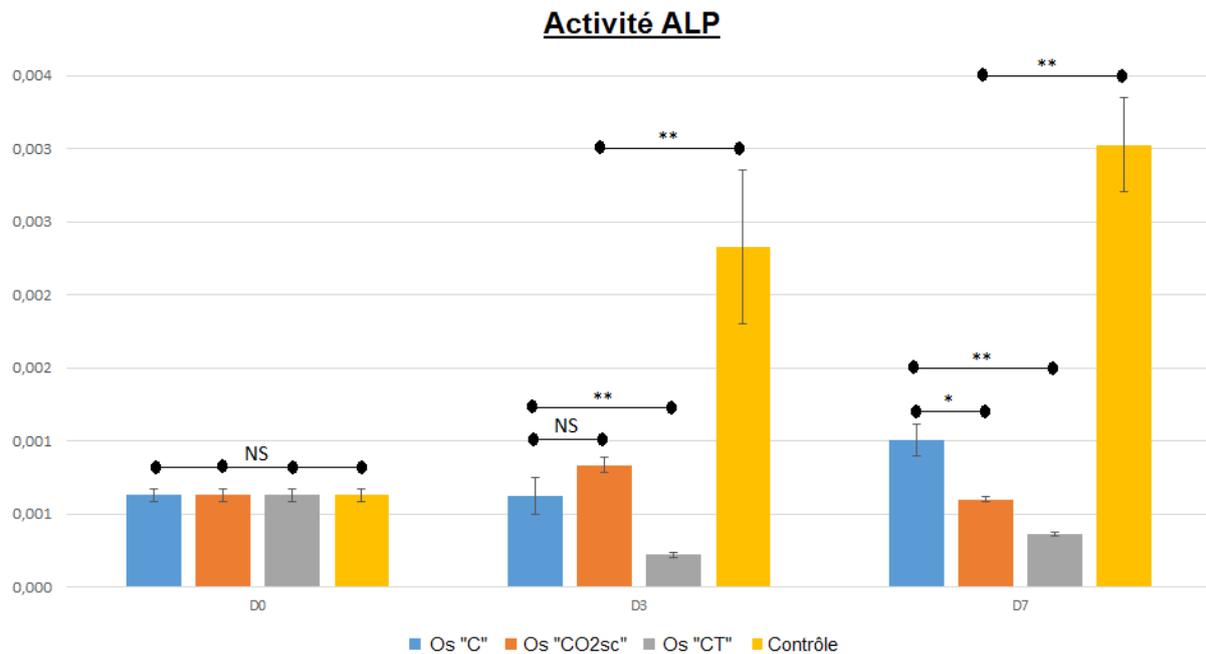


Figure 6 : Activité ALP après culture en milieu conditionné (« os C », « os CO<sub>2</sub>sc », « os CT ») et milieu de culture standard (contrôle) à J0, J3 et J7 (exprimée en unité ALP) (NS : non significatif ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ ).

### *Evaluation de l'adhésion cellulaire des ostéoblastes primaires de rat par Microscopie Electronique à Balayage (Fig. 7-9)*

Sans différence visuelle notable entre les 3 groupes d'os, on retrouve des ostéoblastes répartis aléatoirement sur la surface osseuse, formant par endroit un tapis (Fig. 7). Les ostéoblastes se présentent sous forme de grandes cellules aplaties et allongées (Fig. 8). De nombreuses expansions cytoplasmiques sont visibles. Le développement se fait à la fois sur les surfaces planes mais aussi en profondeur dans les porosités (Fig. 9).

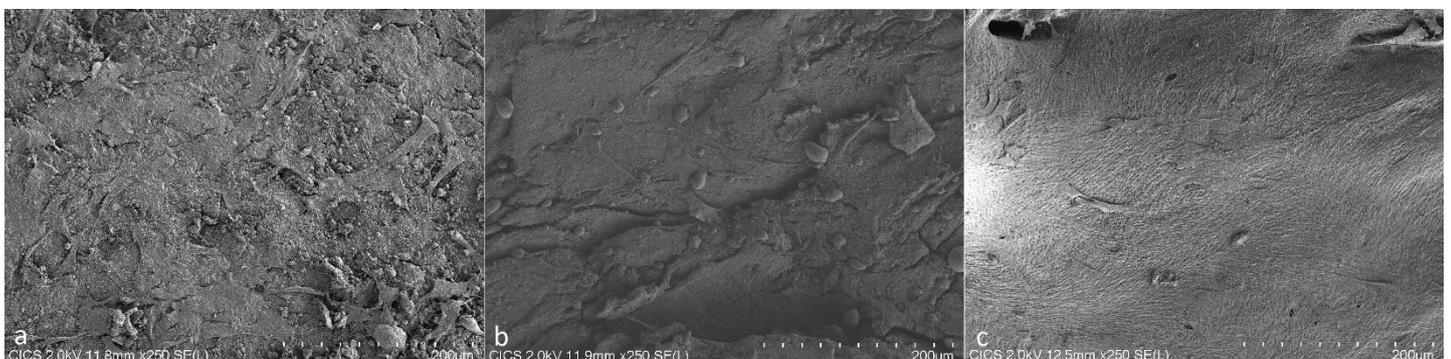


Fig. 7 : Images de MEB des 3 groupes d'os (a : « os C », b : « os CO<sub>2</sub>sc », c : « os CT ») à un faible grossissement (x250).

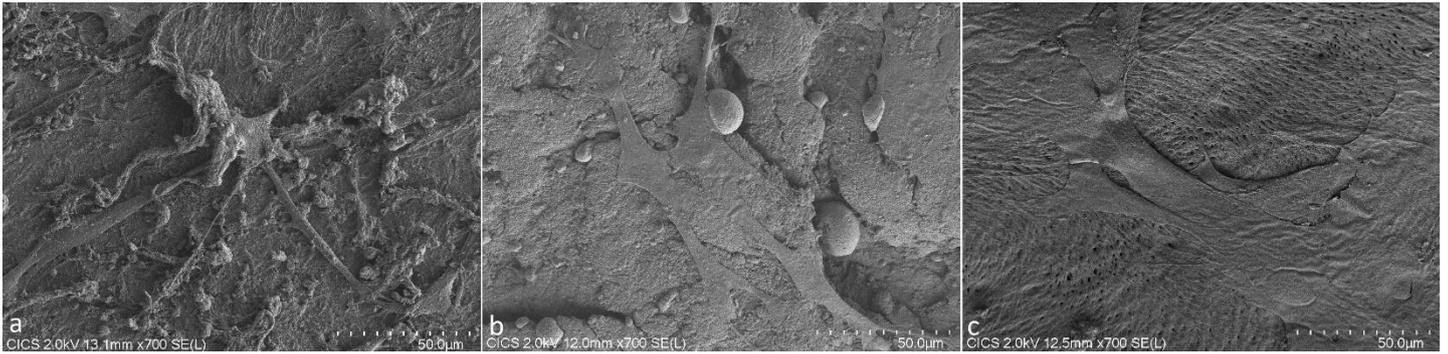


Fig. 8 : Images de MEB des 3 groupes d'os (a : « os C », b : « os CO<sub>2</sub>sc », c : « os CT ») à un grossissement moyen (x700).

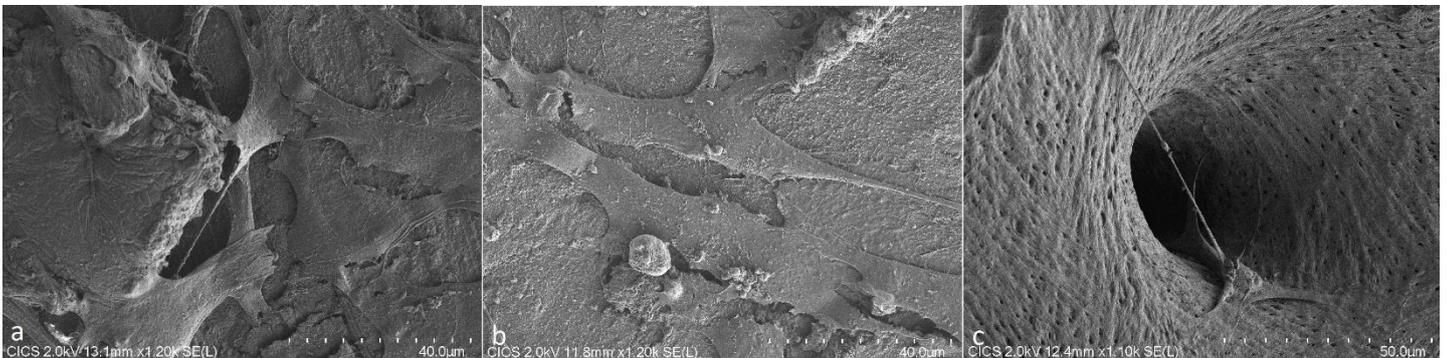


Fig. 9 : Images de MEB des 3 groupes d'os (a : « os C », b : « os CO<sub>2</sub>sc », c : « os CT ») à un grossissement fort (x1100-1200).

***Expériences complémentaires avec des ostéoblastes humains***

Après une semaine de mise en culture, il n'y avait pas de différence significative de viabilité cellulaire (XTT) des ostéoblastes entre les 2 différents groupes d'os (« os C » = 100% (EC 14,4), « os CO<sub>2</sub>sc » = 100,3% (EC 20,7),  $p > 0,1$ ) (Fig. 10).

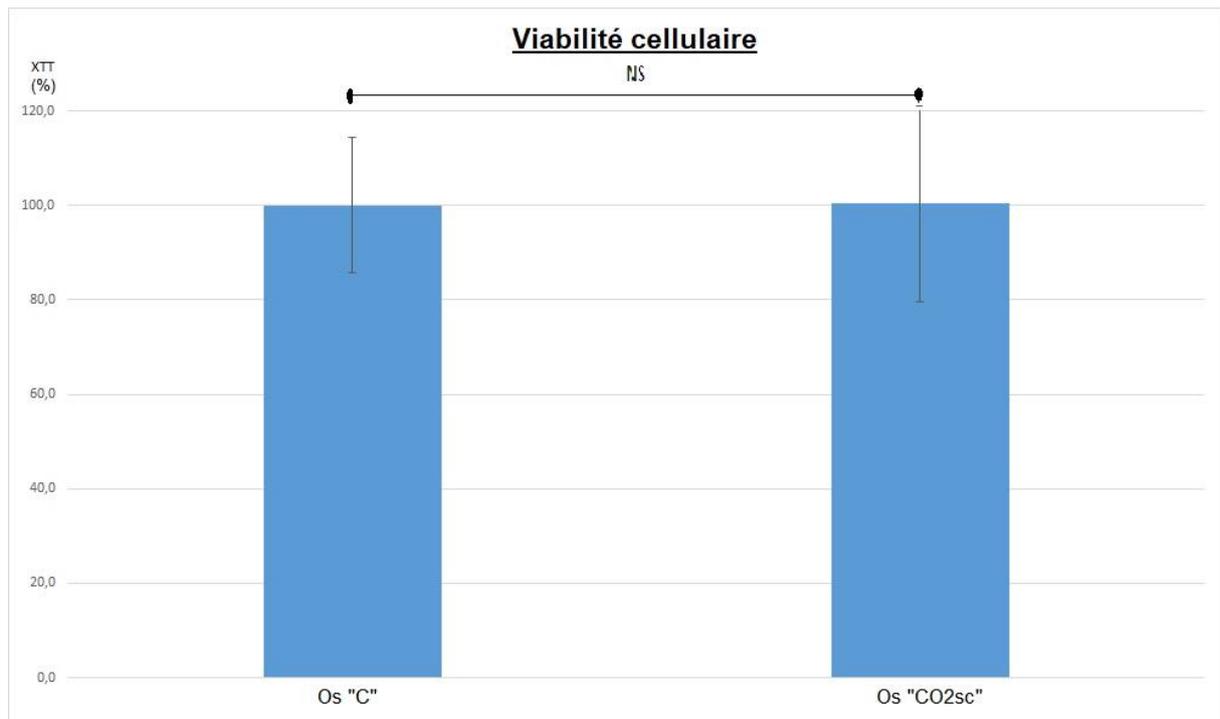


Figure 10 : Viabilité cellulaire moyenne des ostéoblastes après une semaine de culture sur les 2 groupes d'os (exprimée en pourcentage, le groupe « os C » étant la référence 100% ; NS : non significatif).

Concernant l'activité ALP directe (Fig. 11) :

Les activités ALP des disques des 2 groupes d'os ne présentaient pas de différence significative après un, sept ou quatorze jours de culture ( $p > 0,1$ ). L'activité ALP du groupe os « CO<sub>2</sub>sc » était inférieure de 20 à 40% par rapport à l'os « C » aux 2 premiers temps, puis d'environ 10% après 14 jours de culture.

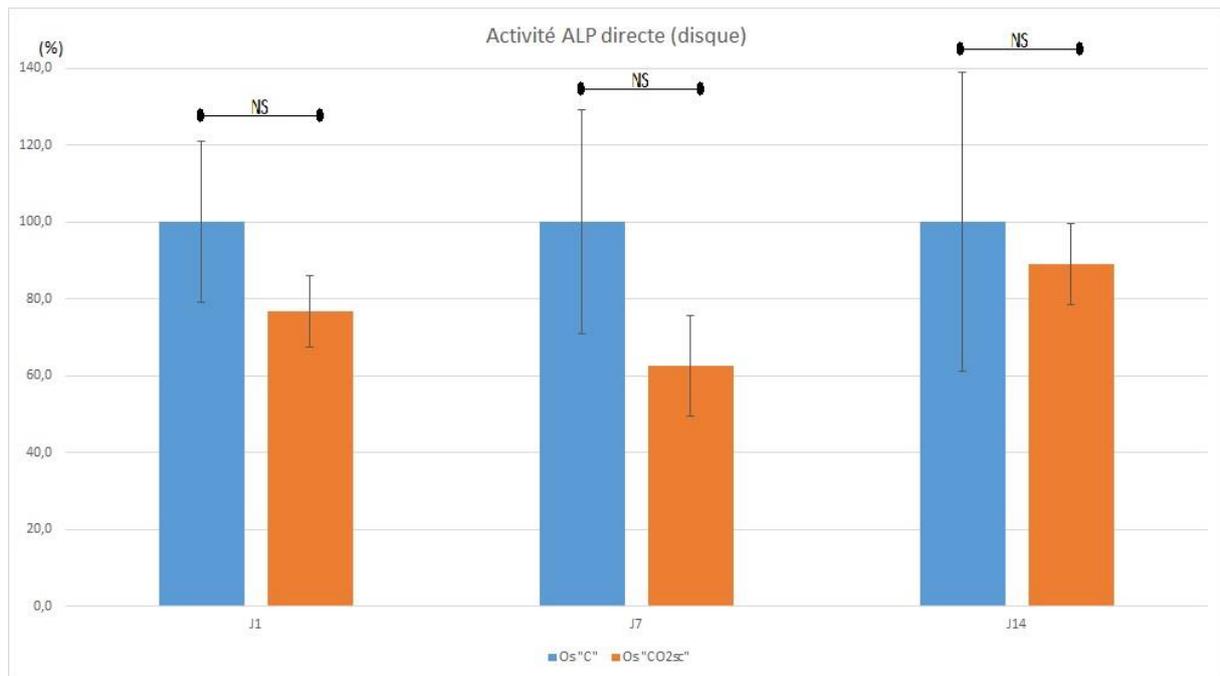


Figure 11 : Activité Alcaline Phosphatase (ALP) des disques d'os (directe) après 1, 7 et 14 jours de culture (exprimée en pourcentage, le groupe « os C » étant la référence 100%) (NS : non significatif).

Concernant l'activité ALP indirecte (Fig. 12) :

Les activités ALP des tapis cellulaires au voisinage des disques des 2 groupes d'os ne présentaient pas de différence significative après un, sept ou quatorze jours de culture ( $p > 0,2$ ). L'activité ALP du groupe os « CO<sub>2</sub>sc » était inférieure d'environ 25% par rapport à l'os « C » après 1 jour de culture puis équivalente après 7 jours, et supérieure d'environ 20% après 14 jours de culture.

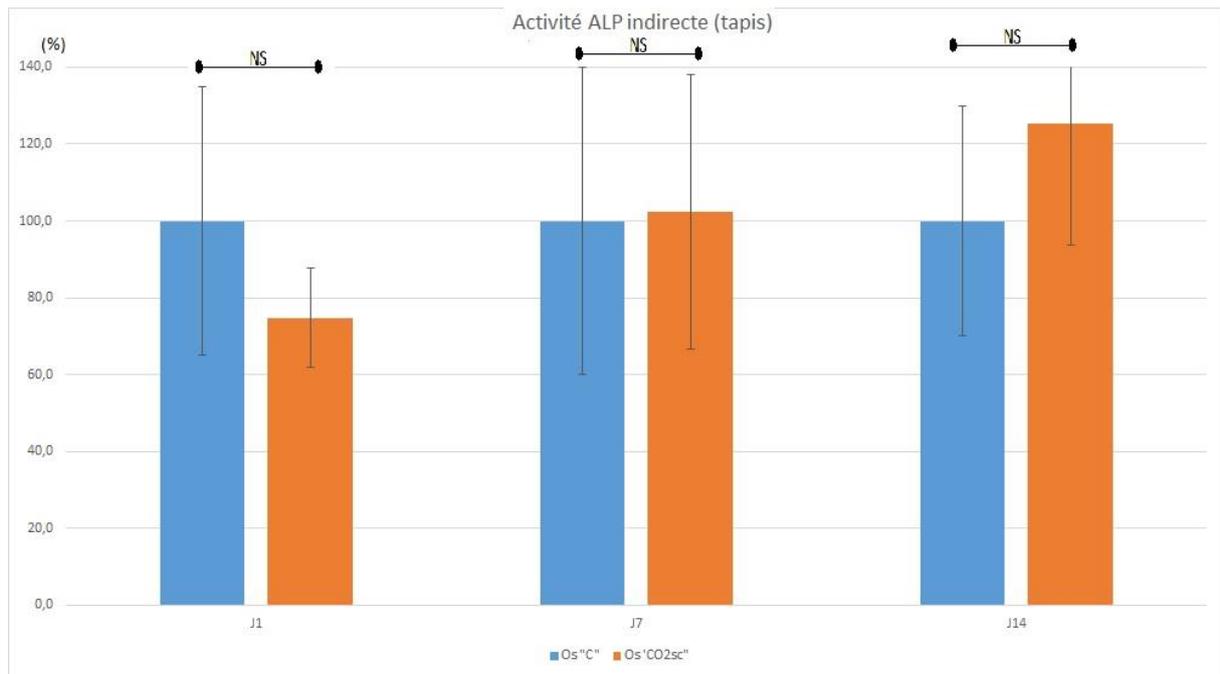


Figure 12 : Activité Alcaline Phosphatase (ALP) des tapis cellulaires au voisinage de disques d'os (indirecte) après 1, 7 et 14 jours de culture (exprimée en pourcentage, le groupe « os C » étant la référence 100%) (NS : non significatif).

### Discussion

Les résultats de cette étude confirment les hypothèses initiales. Un procédé de nettoyage des allogreffes n'utilisant pas de substance chimique assure un niveau de biocompatibilité avec les ostéoblastes *in vitro* similaire à celui d'une allogreffe congelée. Au contraire, l'os traité avec des substances chimiques sur lequel on retrouve des résidus chimiques présente une biocompatibilité plus faible.

Le rôle principal d'un substitut osseux est d'assurer le comblement d'une perte de substance et de servir de trame à la « régénération » du tissu osseux. Quel que soit leur mode de conservation, les allogreffes doivent donc avoir une biocompatibilité importante afin de favoriser la colonisation par les cellules de l'hôte.

Les différentes substances chimiques utilisées dans les traitements complémentaires des allogreffes sont toutes classées comme dangereuses pour la santé selon le règlement européen n° 1272/2008 dit CLP(8). Ces concentrations correspondent à des minima et peuvent être considérées comme faibles dans l'absolu mais elles induisent néanmoins un effet négatif sur la culture d'ostéoblastes *in vitro*. Les activités ALP directe et indirecte des cultures d'ostéoblastes primaires de rats (différenciation ostéoblastique sur le disque d'os et sur le tapis cellulaire au voisinage du disque d'os) étaient significativement plus faibles après 7 et 14 jours dans le

groupe « os CT ». Néanmoins, il n'y avait pas de différence significative concernant la viabilité cellulaire (XTT). Les différences (non significatives) d'activités ALP à J1 ont été expliquées par le fait qu'il persistait toujours des parties molles (périoste, tissus conjonctifs...) sur les allogreffes congelées qui contenaient des molécules perturbant la mesure colorimétrique d'ALP. Ceci a été partiellement corrigé en améliorant le nettoyage des « os C » avant mise en culture.

Le groupe « os CO<sub>2</sub>sc » correspond à un « modèle » d'os traité sans aucune substance chimique. Le scCO<sub>2</sub> est le fluide supercritique le plus utilisé dans l'industrie agro-alimentaire et scientifique depuis 40 ans car il agit comme un solvant totalement neutre et non toxique(9). Les résultats de viabilité cellulaire et de différenciation ostéoblastique et minéralisation dans ce groupe ne présentaient pas de différence significative avec le groupe référence « os C ». Cela confirmait donc qu'un traitement de nettoyage sans substance chimique n'altérerait pas la biocompatibilité de l'os.

Ces résultats sont confortés par l'expérience de culture en milieu conditionné avec les 3 types d'os. Dans ces conditions avec une concentration d'os en contact avec le milieu de culture beaucoup plus importante, la viabilité cellulaire (XTT) et l'activité ostéoblastique (ALP) étaient significativement diminuées d'environ 50% dans le groupe « os CT » (p= 0,03 et 0,001 respectivement) par rapport aux 2 autres groupes d'os (« C » et « CO<sub>2</sub>sc »).

Les résultats des expériences avec les ostéoblastes humains sont plus difficilement interprétables sans toutefois remettre en cause les premières conclusions. En effet malgré une grande variabilité des résultats (écart type), elles confirment aussi qu'il n'y a pas de différence de biocompatibilité entre les groupes d'os « C » et « CO<sub>2</sub>sc ». La variabilité des résultats est possiblement due au fait que le développement des ostéoblastes humains a été beaucoup plus lent lors de la mise en culture dans les mêmes conditions que les ostéoblastes de rats, ce qui est un phénomène déjà constaté(10).

Dans des conditions expérimentales différentes des nôtres (os trempés dans des bains séparés de substances chimiques), Dumas et al. (11) avait constaté des résultats allant dans le même sens que les nôtres sur les ostéoblastes primaires de rats. Après une semaine de culture, il notait une légère diminution de la prolifération cellulaire mais surtout de l'activité ALP de l'ordre de 40 à 60% lors de l'utilisation de l'eau oxygénée et d'hydroxyde de sodium (séparément et en association) mais pas avec l'éthanol. L'explication serait que ces substances chimiques altéraient les phases organiques et inorganiques de l'os provoquant une lyse des protéines de la matrice extracellulaire et une diminution de la présence de facteurs de croissance

régulant le recrutement et l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes tels que les TGF, l'ostéopontin, l'ostéonectin ou les bone morphogenic proteins(12–15). Dans notre étude, la baisse de l'activité ALP directe (sur le disque d'os) dans le groupe « os CT » peut supporter ces explications. La diminution de l'activité ALP indirecte (sur le tapis cellulaire au voisinage du disque d'os) dans le groupe « os CT » et les résultats de cultures en milieux conditionnés quant à eux, traduisent plus probablement un autre phénomène, qui serait un relargage des substances chimiques présentes à la surface de l'os entraînant une toxicité directe pour les ostéoblastes. Rasch et al.(2) se sont concentrés sur l'effet de la méthode de nettoyage par substances chimiques versus la méthode de traitement par sonication sur la décellularisation et la biocompatibilité. Finalement, ils ont constaté une diminution similaire de la biocompatibilité avec ces deux méthodes de traitement par rapport au contrôle. Néanmoins, les greffons traités chimiquement ont été lavés trois fois pendant 2 heures avec du PBS sur un agitateur orbital avant la culture, ce qui a probablement éliminé les résidus des substances chimiques.

Cette étude présente certaines limites. Les écarts-types des résultats des cultures d'ostéoblastes sur les disques d'os témoignent probablement des différences inter-individuelles des os des donneurs sains. Ceci a pu être contrôlé par la répétition des tests avec de l'os de 4 donneurs différents avec des ostéoblastes de 2 espèces différentes (12 exemplaires avec les ostéoblastes de rats, 6 exemplaires avec les ostéoblastes humains). Enfin, il faut nuancer ces résultats expérimentaux car les études cliniques sur l'utilisation d'allogreffes osseuses traitées rapportent des taux d'échec clinique et radiologique faibles (mais l'ostéointégration n'est que rarement étudiée histologiquement)(16–18).

### *Conclusion*

La présence sur les allogreffes osseuses traitées, de résidus de substances chimiques utilisées lors du procédé de nettoyage entraîne une diminution de leur biocompatibilité *in vitro*. Ces constatations doivent faire évoluer les pratiques au niveau des procédés de nettoyage des tissus en limitant ou remplaçant ces substances chimiques afin de favoriser la biocompatibilité tout en assurant un haut niveau de sécurité par rapport au risque microbiologique.

### *Références*

1. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2016 [Internet].. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/donnees/sommaire-organes.htm>

2. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLOS ONE*. 20 juin 2019;14(6):e0218404.
3. Erivan R. Evolution, préparation et traitement des allogreffes de l'appareil locomoteur [Internet] [These de doctorat]. Université Clermont Auvergne (2017-2020); 2019. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2019CLFAS007>
4. Masson E. Allogreffes osseuses et banques de tissus [Internet]. EM-Consulte. [cité 4 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/243458/allogreffes-osseuses-et-banques-de-tissus>
5. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int*. mars 1986;38(3):143-54.
6. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner*. juill 1991;14(1):27-40.
7. Ishida H, Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Characterization of the 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-induced inhibition of bone nodule formation in long-term cultures of fetal rat calvaria cells. *Endocrinology*. janv 1993;132(1):61-6.
8. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 (Text with EEA relevance) [Internet]. OJ L déc 16, 2008. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1272/oj/eng>
9. Zhang X, Heinonen S, Levänen E. Applications of supercritical carbon dioxide in materials processing and synthesis. *RSC Adv*. 12 nov 2014;4(105):61137-52.
10. Taylor SEB, Shah M, Orriss IR. Generation of rodent and human osteoblasts. *Bonekey Rep*. 2014;3:585.
11. Dumas A, Gaudin-Audrain C, Mabilieu G, Massin P, Hubert L, Baslé MF, et al. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. *Biomaterials*. août 2006;27(23):4204-11.
12. Aspenberg P, Tägil M, Kristensson C, Lidin S. Bone graft proteins influence osteoconduction. A titanium chamber study in rats. *Acta Orthop Scand*. août 1996;67(4):377-82.
13. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. déc 2004;22(4):233-41.
14. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juin 1990;87(12):4473-5.
15. Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL. Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro. *Biomaterials*. sept 2003;24(20):3417-26.

16. Butscheidt S, von Kroge S, Stürznickel J, Beil FT, Gehrke T, Püschel K, et al. Allograft Chip Incorporation in Acetabular Reconstruction: Multiscale Characterization Revealing Osteoconductive Capacity. *J Bone Joint Surg Am.* 3 nov 2021;103(21):1996-2005.
17. Erivan R, Matthieu PA, Boyer B, Reina N, Rhame M, Rouchy RC, et al. Use of morselized allografts for acetabular reconstruction during THA revision: French multicenter study of 508 cases with 8 years' average follow-up. *Orthop Traumatol Surg Res.* sept 2019;105(5):957-66.
18. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 7 juin 2017;2(4):224-47.

## RESEARCH ARTICLE

# *In vitro* osteoblast activity is decreased by residues of chemicals used in the cleaning and viral inactivation process of bone allografts

Guillaume Villatte<sup>1,2\*</sup>, Roger Erivan<sup>1,2</sup>, Stéphane Descamps<sup>1,2</sup>, Pierre Arque<sup>1</sup>, Stéphane Boisgard<sup>1,2</sup>, Yohann Wittrant<sup>3</sup>

**1** Clermont Auvergne University, CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, Clermont–Ferrand, France, **2** Departement of Orthopaedic Surgery, CHU Montpied Clermont-Ferrand, Clermont–Ferrand, France, **3** INRAE, Clermont Auvergne University, UMR 1019 Human Nutrition, Clermont-Ferrand, France

\* [gvillatte@chu-clermontferrand.fr](mailto:gvillatte@chu-clermontferrand.fr)



## Abstract

Allograft bone tissue has a long history of use. There are two main ways of preserving allografts: by cold (freezing), or at room temperature after an additional cleaning treatment using chemicals. These chemicals are considered potentially harmful to humans. The aim of the study was (i) to assess the presence of chemical residues on processed bone allografts and (ii) to compare the *in vitro* biocompatibility of such allografts with that of frozen allografts. The presence of chemical residues on industrially chemically treated bone was assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) after extraction. Biocompatibility analysis was performed on primary osteoblast cultures from Wistar rats grown on bone disks, either frozen (F-bone group) or treated with supercritical carbon dioxide with no added chemical (scCO<sub>2</sub>-bone group) or industrially treated with chemicals (CT-bone group). Cell viability (XTT) was measured after one week of culture. Osteoblastic differentiation was assessed after 1, 7 and 14 days of culture by measuring alkaline phosphatase (ALP) activity directly on the bone discs and indirectly on the cell mat in the vicinity of the bone discs. Residues of all the chemicals used were found in the CT-bone group. There was no significant difference in cell viability between the three bone groups. Direct and indirect ALP activities were significantly lower (–40% to –80%) in the CT-bone group after 7 and 14 days of culture ( $p < 0.05$ ). Residues of chemical substances used in the cleaning of bone allografts cause an *in vitro* decrease in their biocompatibility. Tissue cleaning processes must be developed that limit or replace these chemicals to favor biocompatibility.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Villatte G, Erivan R, Descamps S, Arque P, Boisgard S, Wittrant Y (2022) *In vitro* osteoblast activity is decreased by residues of chemicals used in the cleaning and viral inactivation process of bone allografts. PLoS ONE 17(10): e0275480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275480>

**Editor:** Neil Cameron, Monash University, AUSTRALIA

**Received:** June 30, 2022

**Accepted:** September 16, 2022

**Published:** October 10, 2022

**Copyright:** © 2022 Villatte et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript.

**Funding:** The author(s) received no specific funding for this work

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Allograft tissue from the human musculoskeletal system, particularly bone, has a long history of use [1]. From the 1980s onwards, the development of prosthetic joint surgery and therefore of prosthetic revisions, but also of tumor surgery of the limbs, coupled with the ease of

## 4. Etude des propriétés biologiques des allogreffes traitées avec des cultures cellulaires procaryotes (adhérence et développement bactérien)

### Résumé

Introduction : Les chirurgies des membres nécessitant une greffe osseuse sont des procédures complexes où le risque de complications infectieuses est important. La greffe osseuse peut agir comme un corps étranger initialement et faciliter le développement de l'infection. L'objectif du travail était d'évaluer l'influence du mode conservation des greffons osseux sur l'adhérence et le développement bactérien, en particulier pour les greffes traitées par CO<sub>2</sub>sc.

Méthodes : Nous avons analysé le développement de 3 espèces bactériennes couramment impliquées dans les infections de site opératoire (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli*) sur 4 types de greffes (os frais, os congelé, os traité chimiquement et os traité au CO<sub>2</sub>sc). Nous avons réalisé une analyse de l'adhésion initiale à 4h, de la formation de biofilm à 24h et à 72h, par comptage direct des unités formant colonie (UFC) et confirmé ces résultats par visualisation du biofilm au microscope confocal à balayage laser.

Résultats : Les bactéries ont adhéré et se sont développées sur tous les supports avec néanmoins des différences. Le *S. aureus* a adhéré de façon préférentielle à l'os chimiquement traité (lg UFC : 6,56 +/- 0,09 p < 0,001), mais s'est moins bien développé sur ce même type d'os dans le temps (lg UFC : 8,01 +/- 0,22 p < 0,001). Le *S. epidermidis* a adhéré de façon préférentielle à l'os traité au CO<sub>2</sub> supercritique (lg UFC : 3,72 +/- 0,17 p < 0,001) et s'est moins bien développé sur l'os traité chimiquement (lg UFC : 7,76 +/- 0,17 p < 0,001). Et le *E. Coli* a plus adhéré à l'os congelé (lg UFC : 7,47 +/- 0,48 p < 0,001) et s'est moins bien développé sur l'os traité chimiquement (lg UFC : 8,24 +/- 0,48 p = 0,007). En prenant en compte l'ensemble des résultats, l'adhérence et le développement du biofilm sont différents d'une souche à l'autre et sont globalement plus faibles sur les greffons osseux traités (CT ou CO<sub>2</sub>sc) par rapport aux greffons osseux frais et congelés, et ceci en particulier avec les staphylocoques.

Conclusion : Les allogreffes osseuses traitées par un procédé à base de CO<sub>2</sub>sc puis conservées à température ambiante ne constituent pas un « terrain » plus favorable au développement d'une infection bactérienne du site opératoire par rapport aux autres types de greffes osseuses, qui sont globalement équivalentes.

## *Introduction*

Les chirurgies des membres nécessitant une greffe osseuse sont des procédures complexes où le risque de complications infectieuses est d'autant plus important et les conséquences lourdes (destruction du greffon et chirurgies itératives pouvant aller jusqu'à l'amputation).

Ce risque est difficilement évaluable car dépendant fortement du patient, de l'indication chirurgicale, et du type et volume de greffe osseuse. Ce risque est inférieur à 3% pour les allogreffes d'os spongieux, comme en témoignent les nombreuses études sur les révisions d'arthroplastie de hanche avec perte de substance acétabulaire traitée par greffe osseuse. Pour les allogreffes massives le risque est plus important, entre 5% et 13%(1).

La revascularisation et l'ostéointégration d'un greffon sont des processus longs et parfois partiels. Ainsi le greffon osseux se comporte comme un « corps étranger inerte » au moins temporairement. Le développement d'une infection au contact de ce greffon, que ce soit par contamination directe per-opératoire ou secondaire par voie hématogène, peut être comparable à celui d'un dispositif médical implantable comme une prothèse articulaire.

L'adhérence des bactéries à la surface « du corps étranger » correspond à la première étape du développement de l'infection via la formation du biofilm(2). Ce phénomène d'adhérence est régi par différents éléments dont les caractéristiques spécifiques des bactéries, les conditions environnementales locales, mais aussi les propriétés physico-chimiques et structurales (à l'échelle micro et nano) de la surface(2,3). Malgré de nombreuses publications sur le sujet, les mécanismes par lesquels la surface influence le phénomène d'adhérence bactérienne restent non complètement élucidés(4).

Les résultats de nos analyses en MEB et microscanner ne semblent pas montrer de différence structurelle entre les greffons congelés et ceux nettoyés par traitement au CO<sub>2</sub>sc. Les limites techniques de ces méthodes d'analyse doivent néanmoins faire rester prudent quant aux éventuelles modifications de surface et donc d'adhérence bactérienne.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'adhérence et le développement bactérien au contact de greffons osseux frais, congelés, et nettoyés par traitement physico-chimique ou au CO<sub>2</sub>sc.

L'hypothèse était que le traitement au CO<sub>2</sub>sc des greffons osseux ne favorisait pas les phénomènes d'adhérence et de développement bactérien par rapport aux autres modes de conservation des greffons osseux.

### *Matériel et Méthodes*

#### *Autorisation éthique*

L'ensemble des tissus et cellules d'origine humaine provient de la banque de tissus Ostéobanque et du service d'orthopédie et traumatologie du CHU de Clermont-Ferrand qui bénéficient d'une autorisation d'utilisation pour la recherche (DC-2021-4555).

#### *Sélection et conservation des greffons osseux*

Tous les fragments osseux sont issus de résidus post opératoires de prothèse totale de hanche. Pour une souche donnée, les fragments sont issus du même patient. L'os spongieux a été découpé en cube de 5x5x5mm à l'aide d'une scie chirurgicale en milieu stérile puis réparti en 4 groupes selon le mode de conservation :

- Frais : à 4°C dans du sérum physiologique, au maximum 3 jours (groupe os « F »)
- Congelé directement à -20° Celsius sans adjonction de conservateur entre 3 et 5 jours (groupe « os C ») ;
- À température ambiante, après un traitement complémentaire associant un lavage mécanique au serum physiologique puis avec du dioxyde de carbone supercritique (scCO<sub>2</sub>) sans adjonction d'aucune substance chimique (groupe « os CO<sub>2</sub>sc ») ;
- À température ambiante, après un traitement complémentaire industriel associant un lavage mécanique avec de l'eau et un détergent contenant de l'hydroxyde de sodium NaOH, de l'hypochlorite de sodium NaClO et du pyrophosphate du tetrapotassium K<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub> pulsé, puis des bains successifs de divers substances chimiques (propanone C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, urée CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), avant une déshydratation par de l'éthanol C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH et un séchage thermique (groupe os « CT »).



Figure 1 : Photographie des 4 types de greffons utilisées : Os frais (F), os congelé (C), os traité chimiquement (CT) et os traité au Dioxyde de Carbone supercritique (CO<sub>2</sub>sc).

Tous les fragments ont bénéficié d'une étape de trempage de 30min dans du bouillon tryptone soja (TSB) pour les réhydrater avant la mise en culture avec les bactéries.

### ***Souches bactériennes et préparation des solutions de culture***

Les souches utilisées sont des souches résistantes de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli* dont les antibiogrammes sont disponibles en annexe 1. Ce choix a été fait pour limiter les effets liés à l'antibioprophylaxie per opératoire systématique lors des chirurgies prothétiques (Céfazoline)(5,6). Leur capacité à fabriquer du biofilm a été testée préalablement par un test au cristal violet. Un premier repiquage est réalisé à partir des échantillons de la collection de bactéries du CHU de Clermont Ferrand. Un deuxième repiquage à 24 heures (h) sert à préparer une solution de TSB contaminée correspondant à une solution de  $10^8$  bactéries par millilitre (Densité optique 600nm cible) puis diluée jusqu'à  $10^{-4}$ .

### ***Mise en culture sur les greffons osseux***

Six exemplaires de chaque type de greffons osseux étaient testés pour chaque souche bactérienne et chacun des temps de culture. Les 4 types d'os étaient disposés dans 4 microplaques Falcon® 24 puits différentes et inoculés avec 1,5ml de solution à la concentration bactérienne de  $10^{-4}$ . Ainsi 18 fragments d'os étaient destinés au comptage des colonies (T4h, T24h, T72h), 2 à la coloration pour le microscope confocale et 3 étaient les témoins négatifs (T-4h, T-24h, T-72h) comme présenté dans la figure 1. L'incubation a été réalisée sous atmosphère contrôlée à 37° avec une agitation à 15/min pour une durée maximum de 72h.



Figure 2 : Exemple de microplaque 24 puits correspondant à un type d'os pour une souche. T4h, T24h et T72h représentent les fragments analysés aux différents temps, C+T24h représente les colorations et T-4h, T-24h et T-72h représentent les témoins de chaque temps.

### ***Quantification de l'adhérence initiale et de la formation de biofilm***

L'adhérence initiale est définie comme la capacité des bactéries à établir des liaisons durables avec une surface dans une période allant de 4 à 6h. A T4h, les fragments ont bénéficié d'un triple lavage avec 1,5ml de TSB en agitation à 600/min pendant 1 min afin d'éliminer la phase planctonique. Les bactéries adhérentes ont ensuite été récupérées. Pour *E. coli*, la récupération s'est faite en solution de Lécithine (Diluant Neutralisant Pharmacopée : DNP) par sonication pendant 5min à 47 Khz puis vortex à 2500/min pendant 2min. Et pour les *Staphylocoques*, la récupération s'est faite en solution de Lécithine par vortex seul 2500/min pendant 2min. Après récupération du centrifugat et dilution progressive, la solution était étalée sur plaque d'agar (3 dilutions successives avec 2 plaques par dilution) puis les plaques étaient placées en étuve à 37°C. Le nombre d'unités formant colonie (UFC) était compté à 48h (exprimé en Log10 (lg)).

Tous les autres fragments ont aussi bénéficié d'un triple lavage à T4h afin d'éliminer la phase planctonique et ne garder que les bactéries adhérentes avant d'être remis en culture jusqu'à T24h et T72h (avec pour ces derniers un triple lavage à T24h aussi). Le biofilm précoce était évalué à T24h et le biofilm mature à T72h, avec un comptage des colonies selon la même méthodologie que précédemment.

### ***Microscope confocale à balayage laser***

Les échantillons inoculés ont été récupérés à T24h et colorés avec le kit de coloration Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit (L7012, Invitrogen) en accord avec les instructions du fabricant (7). La solution de colorant contenait du SYTO<sup>®</sup>9 (fluorescence verte ; excitation 480 nm/émission 500 nm) et de l'iodure de propidium (fluorescence rouge ; excitation 490 nm/émission 635 nm) en proportion égale. La durée de contact était de 15 min à 37°C dans l'obscurité. Les fragments étaient ensuite rincés trois fois au TSB. L'observation a été réalisée, à température ambiante, au microscope confocal Zeiss LSM80 Airyscan (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., le Pecq, France) en utilisant l'objectif 20 (20XNA 1,3 Plan-Neofluar objective). L'analyse subjective de la formation des biofilms et la mesure de l'épaisseur maximale en 6 points du biofilm en  $\mu\text{m}$  ont été réalisées avec le logiciel d'analyse d'image Fiji(8).

### ***Analyses statistiques***

L'analyse statistique a consisté en un test de Kruskal-Wallis pour la différence globale (entre les 4 types os) et un test de Dunn en post-hoc (si KW significatif). Les mesures d'épaisseurs du biofilm sont exprimées en moyenne +/- écart type et comparées par un test de Kruskal-Wallis. Une p value < 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. L'analyse a été réalisée grâce au logiciel STATA (StataCorp LLC, College Station, TX, USA).

## ***Résultats***

### ***Staphylocoque aureus*** (Figure 3)

#### **\* Adhérence bactérienne**

L'adhérence était significativement plus forte sur l'os CT (6,56 +/- 0,09 lg UFC ; p < 0,001) tandis qu'elle était plus faible sur l'os CO<sub>2</sub>sc (5,41 +/- 0,20 lg UFC ; p < 0,001). L'adhérence dans les groupes os F et C étaient intermédiaires sans différence significative (respectivement 5,96 +/- 0,17 lg et 5,89 +/- 0,30 lg UFC).

#### **\* Formation du biofilm**

A T24h, le nombre d'UFC était significativement plus faible dans les groupes os C et CT (8,21 +/- 0,08 lg et 8,01 +/- 0,22 lg UFC respectivement) que dans les groupes os F et CO<sub>2</sub>sc (8,46 +/- 0,11 lg et 8,49 +/- 0,14 lg UFC respectivement) (p < 0,001).

A T72h, le nombre d'UFC était significativement plus faible dans les groupes os CT et CO<sub>2</sub>sc (7,86 +/- 0,27 lg et 7,85 +/- 0,22 lg UFC respectivement) que dans les groupes os C et F (8,06 +/- 0,21 lg et 8,06 +/- 0,20 lg UFC respectivement) (p = 0,02).

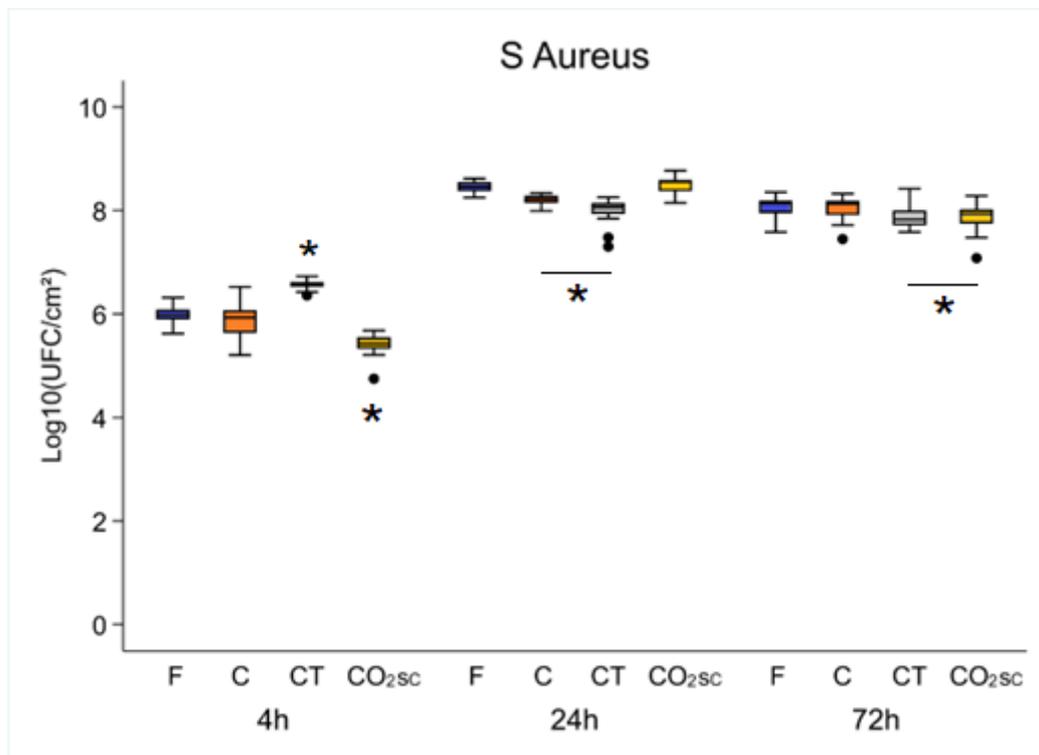


Figure 3 : Nombre d'UFC (lg/cm<sup>2</sup>) pour chaque temps pour S. Aureus. A T4h les UFCs représentent le nombre de bactéries adhérant au support, et à T24 et T72h le développement du biofilm.

#### *Staphylocoque epidermidis* (Figure 4)

##### \* Adhérence bactérienne

L'adhérence était significativement plus forte sur l'os CO<sub>2</sub>sc (3,72 +/- 0,17 lg UFC ; p < 0,001) tandis qu'elle était plus faible sur l'os CT (1,6 +/- 1,16 lg UFC ; p = 0,007). L'adhérence dans les groupes os F et C était intermédiaire sans différence significative (respectivement 2,82 +/- 0,29 lg et 2,66 +/- 0,22 lg UFC).

##### \* Formation du biofilm

A T24h, le nombre d'UFC était significativement plus faible dans le groupe os CT (7,65 +/- 0,20 lg UFC ; p < 0,001) que dans les 3 autres groupes (8,86 +/- 0,17 lg ; 8,73 +/- 0,22 lg ; et 8,71 +/- 0,13 lg UFC pour les groupes os CO<sub>2</sub>sc, C et F respectivement).

A T72h, le nombre d'UFC était significativement plus faible dans les groupes os CO<sub>2</sub>sc et CT (8,09 +/- 0,16 lg et 7,76 +/- 0,17 lg UFC respectivement) que dans les groupes os F et C (8,79 +/- 0,20 lg et 8,52 +/- 0,35 lg UFC respectivement) (p = 0,012).

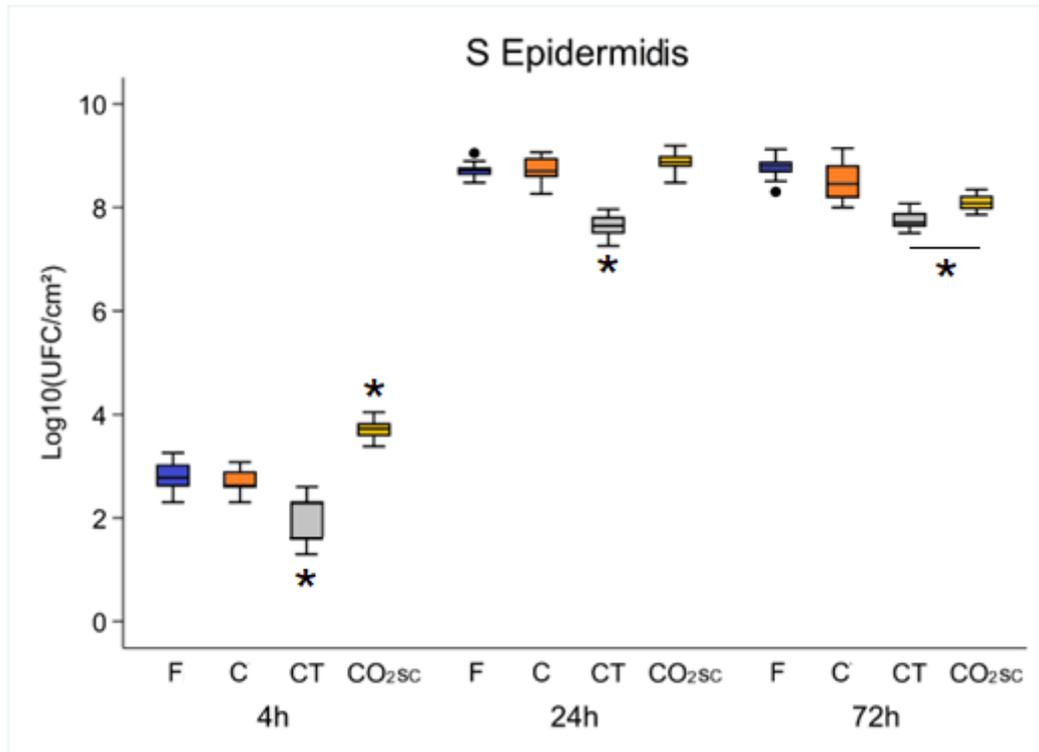


Figure 4 : Nombre d'UFC (lg/cm<sup>2</sup>) pour chaque temps pour *S. epidermidis*. A T4h les UFCs représentent le nombre de bactéries adhérant au support, et à T24 et T72h le développement du biofilm.

### *Escherichia coli* (Figure 5)

#### \* Adhérence bactérienne

L'adhérence était significativement plus forte sur l'os C (7,47 +/- 0,48 lg UFC ; p = 0,007) tandis qu'elle était plus faible sur l'os CO<sub>2</sub>sc (6,66 +/- 0,32 lg UFC ; p = 0,02). L'adhérence dans les groupes os F et CT étaient intermédiaires sans différence significative (respectivement 6,96 +/- 0,22 lg et 6,95 +/- 0,24 lg UFC).

#### \* Formation du biofilm

A T24h, le nombre d'UFC était significativement plus faible dans les groupes os CO<sub>2</sub>sc et CT (7,96 +/- 0,37 lg et 8,24 +/- 0,37 lg UFC respectivement) que dans les groupes os C et F (8,65 +/- 0,46 lg et 8,89 +/- 0,34 lg UFC respectivement) (p < 0,001 et p = 0,04).

A T72h, le nombre d'UFC était significativement plus faible dans le groupe os CT (7,58 +/- 0,41 lg UFC ; p < 0,001) que dans les 3 autres groupes (9,04 +/- 0,40 lg ; 9,22 +/- 0,48 lg ; et 9,32 +/- 0,42 lg UFC pour les groupes os C, CO<sub>2</sub>sc et F respectivement).

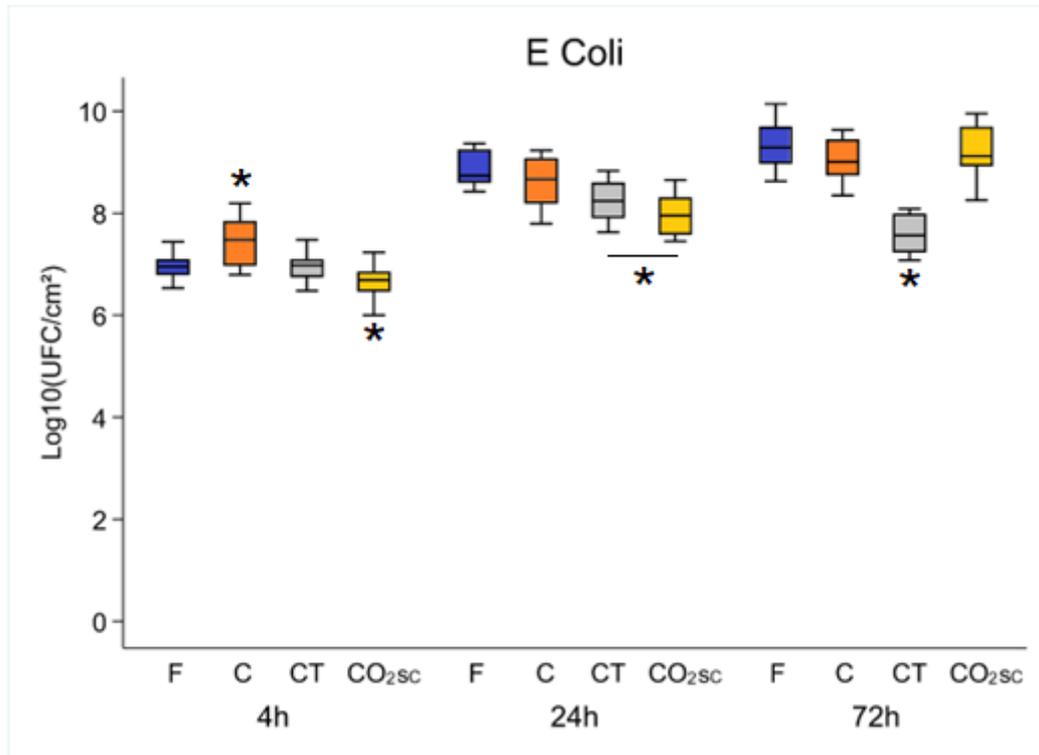


Figure 5 : Nombre d'UFC (lg/cm<sup>2</sup>) pour chaque temps pour E. coli. A T4h les UFCs représentent le nombre de bactéries adhérant au support, et à T24 et T72h le développement du biofilm.

### Microscope confocale à balayage laser pour l'analyse de la formation du biofilm des 3 souches bactériennes (Figures 6-8)

De manière générale, sans distinction du mode de conservation du greffon, on constate sur les différentes images, la présence d'éléments verts en plus ou moins grande quantité correspondant au biofilm (cellules cultivables UFC évaluées lors du comptage + bactéries viables non cultivables), ainsi que d'éléments rouges témoignant de bactéries mortes.

C'est avec *S. aureus* que la formation du biofilm paraît la plus importante.

De manière subjective, les images de l'os CO<sub>2</sub>sc ne semblent pas montrer de biofilm supplémentaire pour les 3 souches par rapport aux autres types d'os.

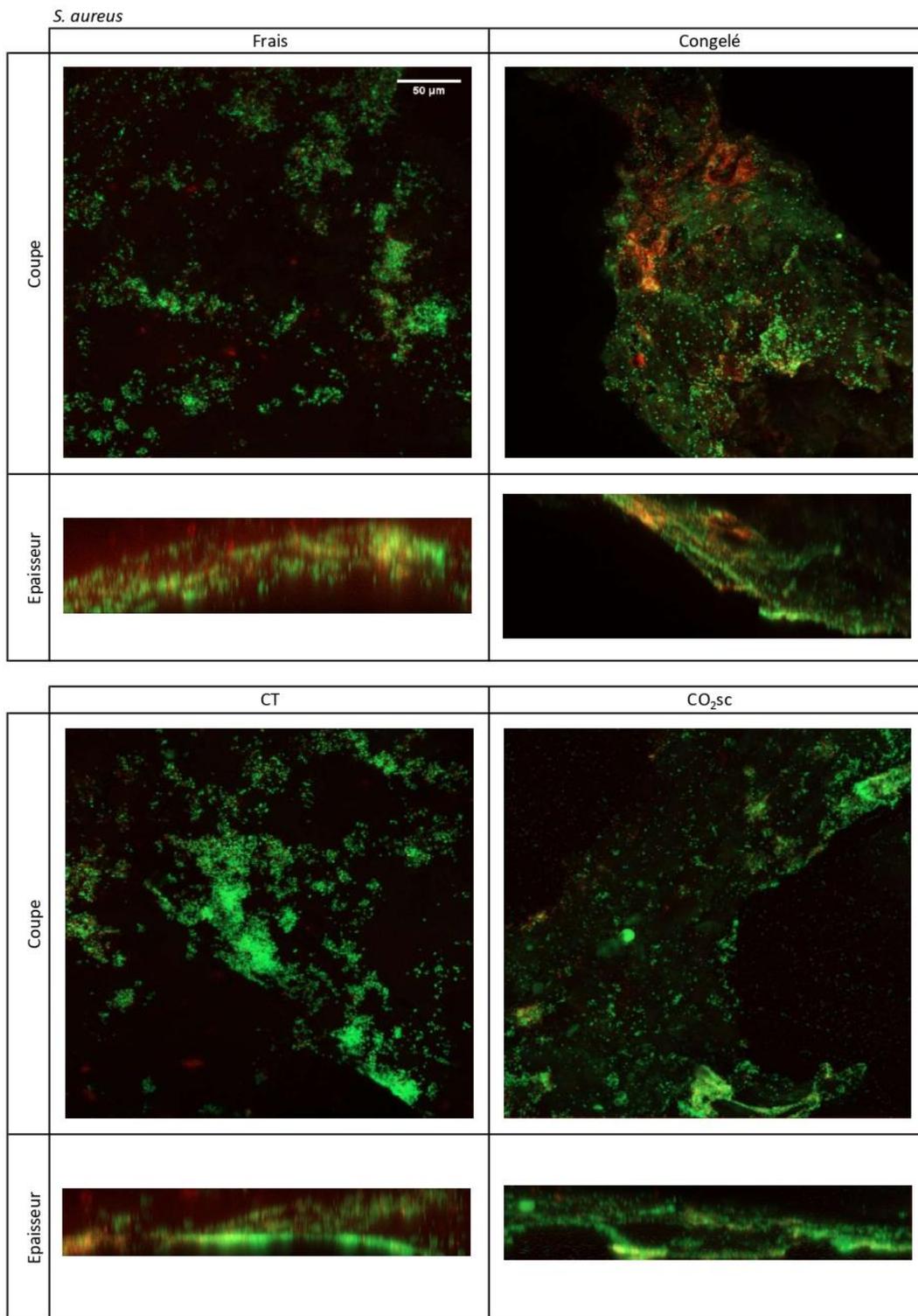


Figure 6 : Images de microscope confocal (x20), présentées en vue en coupe et vue en épaisseur pour *S. Aureus*.

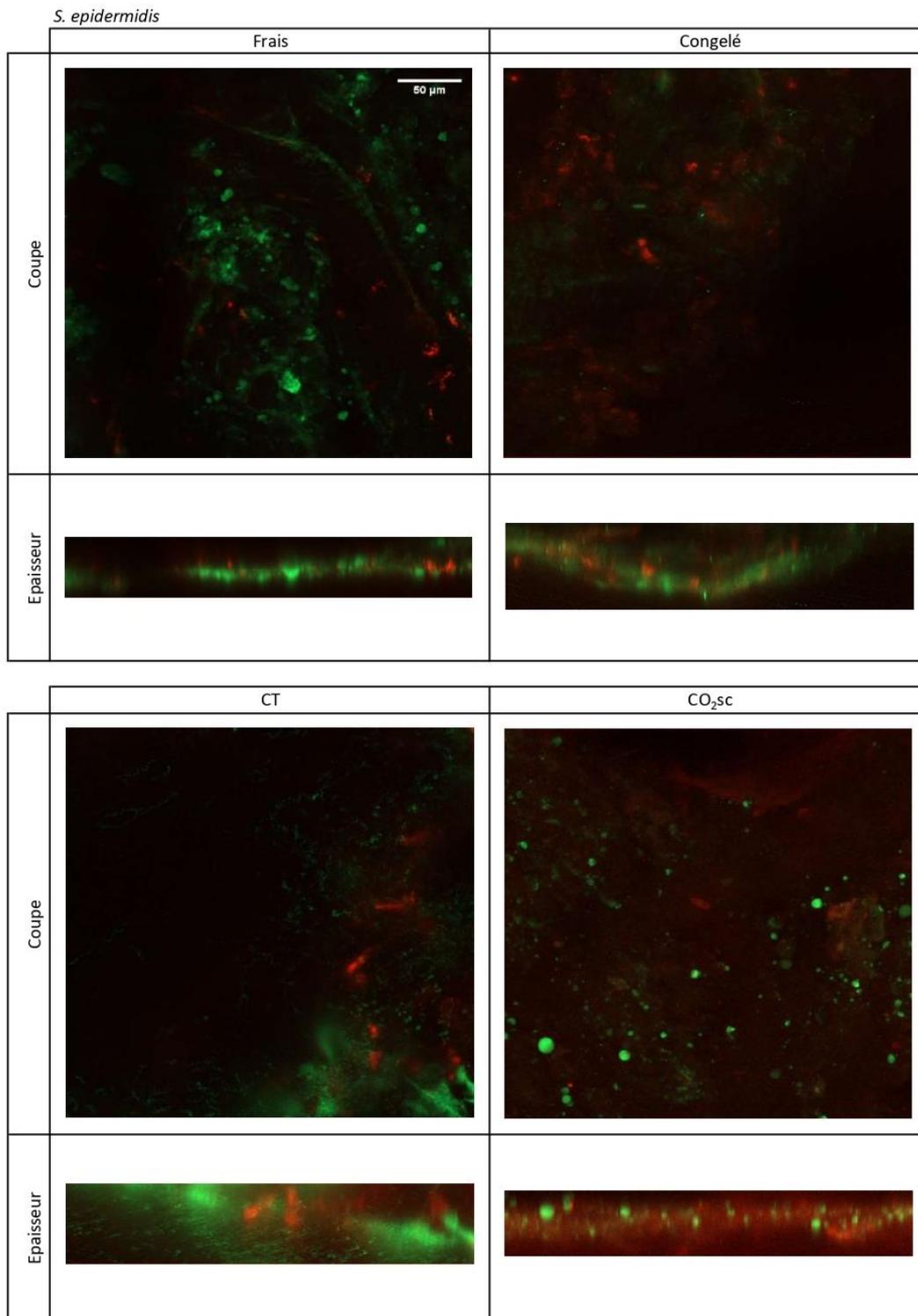


Figure 7 : Images de microscope confocal (x20), présentées en vue plane et vue en épaisseur pour *S. Epidermidis*.

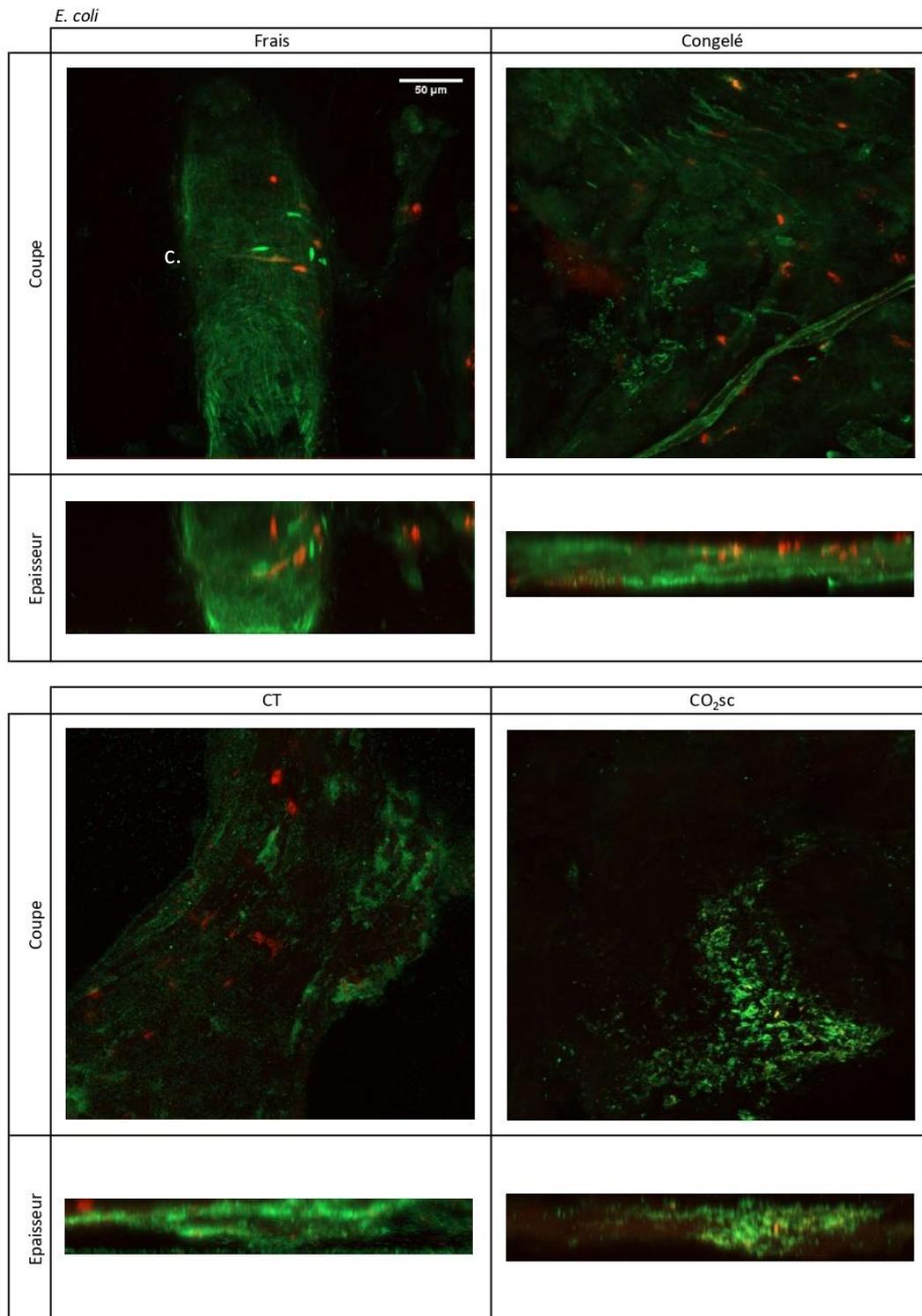


Figure 4 : Images de microscope confocal (x20), présentées en vue plane et vue en épaisseur pour *E. Coli*.

### *Discussion*

Cette étude a permis d'illustrer l'adhérence et le développement du biofilm de 3 souches bactériennes sur des fragments osseux conservés selon 4 modalités différentes (frais, congelé,

traité chimiquement ou au CO<sub>2</sub>sc). Les résultats confirment l'hypothèse que le traitement au CO<sub>2</sub>sc ne péjore pas ces phénomènes par rapport aux autres modes de conservation.

L'originalité de ce travail réside dans le fait d'apporter des données générales sur le développement des infections dans un contexte de greffe osseuse, en s'intéressant spécifiquement à l'impact du mode de conservation des greffons osseux humains utilisés en pratique courante en orthopédie (autogreffe fraîche, allogreffe congelée, allogreffe traitée chimiquement ou non).

En prenant en compte l'ensemble des résultats, l'adhérence et le développement du biofilm sont différents d'une souche à l'autre et sont globalement plus faibles sur les greffons osseux traités (CT ou CO<sub>2</sub>sc) par rapport aux greffons osseux frais et congelés, et ceci en particulier avec les staphylocoques.

Les différences constatées, bien que statistiquement significatives, sont cependant modestes aux vues des échelles de grandeur. Ainsi, si l'on considère l'os frais (équivalent de l'autogreffe) comme le gold standard compte tenu de l'expérience clinique, il est difficile d'extrapoler et de considérer qu'un des modes de conservation est supérieur aux autres.

Ces résultats vont dans le sens de l'étude de Nysirios et al.(9) qui n'avaient pas retrouvé de différences d'adhérence bactérienne et de développement entre 3 substituts osseux (xéno greffe, allogreffe, matériaux synthétique) avec 5 souches bactériennes.

Différentes études montrent que les propriétés physiques (rugosité, nanostructure...) (10–16) et chimiques (structure moléculaire, charge électrostatique, hydrophilie...) (17–22) des biomatériaux influent sur l'adhérence initiale et la formation du biofilm, sans que ceci ne soit parfaitement compris. D'une manière générale, les tissus composés de lipides et de protéines (os frais et congelé) semblent favoriser la formation des biofilms. Ces derniers jouent le rôle de récepteurs pour les bactéries, notamment pour les staphylococcus (18,23). Historiquement les matériaux poreux étaient considérés comme plus favorables au développement des infections aussi (versus des structures pleines)(24). Cependant cela est désormais remis en cause notamment avec la découverte de l'effet antibactérien produit par la modification de la structure de la surface du matériau à l'échelle micro et nanométrique(25,26).

Une limite de cette étude est l'utilisation d'un modèle expérimentale *in vitro* qui n'est qu'une approximation de la réalité. En effet le développement des bactéries sur les fragments osseux a été régulièrement « perturbé » par les lavages (T4h et T24h) qui étaient nécessaires afin de contrôler au mieux l'environnement et standardiser la méthode. Cependant cela ne correspond aux « conditions normales » de développement d'une infection dans un site

opératoire lors de l'implantation d'une greffe osseuse (pas de lavage itératif, apport de nutriment permanent...). Ce biais potentiel a été contrôlé par une expérience complémentaire se rapprochant plus des conditions cliniques (aucun lavage intermédiaire pendant 72h) qui a conclu à des résultats complètement superposables (annexe 2).

Ces conditions expérimentales ne prennent non plus pas en compte les phénomènes immunologiques potentiels (au sens large du terme). Ainsi, aussi bien les caractéristiques biologiques du donneur, que la compatibilité du greffon avec l'hôte receveur, mais aussi la présence de cellules immunitaires vivantes au sein du greffon (dans le cas d'une autogreffe fraîche) vont pouvoir influencer positivement ou négativement sur le développement d'une infection (27). Seul le biais lié aux différences interindividuelles du donneur a pu être contrôlé en sélectionnant un seul donneur pour chacune des manipulations.

Autre limite, les durées de congélation comprises entre 3 et 5 jours sont loin de pouvoir être comparables à celles pratiquées dans une banque de tissus où la durée de quarantaine est au minimum de plusieurs semaines. Cette différence peut limiter les transformations subies par les protéines et les lipides dues à la congélation, même si ces altérations semblent survenir pour des durées plus longues (années) (28).

Concernant le mode de comptage des UFC, il présente la limite de ne montrer que les bactéries cultivables, au détriment des bactéries viables non cultivables forcément présentes dans ces conditions (29). L'analyse au microscope confocale permet d'illustrer la présence du biofilm qui comprend à la fois les bactéries cultivables ou non ainsi que les cellules mortes. Cette analyse reste cependant subjective car il n'était pas possible de réaliser des mesures fiables de la quantité de biofilm avec ce matériel.

### *Conclusion*

Les allogreffes osseuses traitées par un procédé à base de CO<sub>2</sub>sc puis conservées à température ambiante ne constituent pas un « terrain » plus favorable au développement d'une infection bactérienne du site opératoire par rapport aux autres types de greffes osseuses, qui sont globalement équivalentes.

### *Références*

1. Charrois O, Kerboull L, Vastel L, Courpied JP, Kerboull M. [Femoral reconstruction with massive allograft implanted in a split femur. Mid-term results of 18 reconstructions]. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot. déc 2000;86(8):801-8.

2. Busscher HJ, van der Mei HC. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog.* janv 2012;8(1):e1002440.
3. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998;43(3):338-48.
4. Crawford RJ, Webb HK, Truong VK, Hasan J, Ivanova EP. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Adv Colloid Interface Sci.* 1 nov 2012;179-182:142-9.
5. Yamada K, Matsumoto K, Tokimura F, Okazaki H, Tanaka S. Are Bone and Serum Cefazolin Concentrations Adequate for Antimicrobial Prophylaxis? *Clin Orthop Relat Res.* déc 2011;469(12):3486-94.
6. Chang Y, Shih HN, Chen DW, Lee MS, Ueng SWN, Hsieh PH. The concentration of antibiotic in fresh-frozen bone graft. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume.* oct 2010;92-B(10):1471-4.
7. Robertson J, McGoverin C, Vanholsbeeck F, Swift S. Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Front Microbiol.* 12 avr 2019;10:801.
8. Fiji: ImageJ, with « Batteries Included » [Internet]. [cité 20 juill 2022]. Disponible sur: <https://fiji.sc/>
9. Nisyrios T, Karygianni L, Fretwurst T, Nelson K, Hellwig E, Schmelzeisen R, et al. High Potential of Bacterial Adhesion on Block Bone Graft Materials. *Materials (Basel).* 1 mai 2020;13(9):2102.
10. Bhadra CM, Khanh Truong V, Pham VTH, Al Kobaisi M, Seniutinas G, Wang JY, et al. Antibacterial titanium nano-patterned arrays inspired by dragonfly wings. *Sci Rep.* déc 2015;5(1):16817.
11. Damiati L, Eales MG, Nobbs AH, Su B, Tsimbouri PM, Salmeron-Sanchez M, et al. Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *J Tissue Eng.* 1 janv 2018;9:2041731418790694.
12. Damiati L, Eales MG, Nobbs AH, Su B, Tsimbouri PM, Salmeron-Sanchez M, et al. Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *J Tissue Eng.* 1 janv 2018;9:204173141879069.
13. Fadeeva E, Truong VK, Stiesch M, Chichkov BN, Crawford RJ, Wang J, et al. Bacterial Retention on Superhydrophobic Titanium Surfaces Fabricated by Femtosecond Laser Ablation. *Langmuir.* 15 mars 2011;27(6):3012-9.
14. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials.* févr 2010;31(4):706-13.
15. Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials.* 1 janv 2001;22(14):2043-8.

16. Truong VK, Lapovok R, Estrin YS, Rundell S, Wang JY, Fluke CJ, et al. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials*. 1 mai 2010;31(13):3674-83.
17. Tang H, Wang A, Liang X, Cao T, Salley SO, McAllister JP, et al. Effect of surface proteins on *Staphylococcus Epidermidis* adhesion and colonization on silicone. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. août 2006;51(1):16-24.
18. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Perdreau FS, et al. Fibronectin, Fibrinogen, and Laminin Act as Mediators of Adherence of Clinical *Staphylococcal* Isolates to Foreign Material. *The Journal of Infectious Diseases*. oct 1988;158(4):693-701.
19. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1998;43(3):338-48.
20. Hogt AH, Dankert J, Feijen J. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a Hydrophobic Biomaterial. *Microbiology*. 1 sept 1985;131(9):2485-91.
21. Hogt AH, Dankert J, De Vries JA, Feijen J. Adhesion of Coagulase-negative *Staphylococci* to Biomaterials. *Microbiology*. 1 sept 1983;129(9):2959-68.
22. Brokke P, Dankert J, Carballo J, Feijen J. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* onto Polyethylene Catheters in vitro and in vivo: A Study on the Influence of various Plasma Proteins. *J Biomater Appl*. 1 janv 1991;5(3):204-26.
23. Tegoulia VA, Cooper SL. *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 avr 2002;24(3):217-28.
24. Clauss M, Trampuz A, Borens O, Bohner M, Ilchmann T. Biofilm formation on bone grafts and bone graft substitutes: comparison of different materials by a standard in vitro test and microcalorimetry. *Acta Biomater*. sept 2010;6(9):3791-7.
25. Nishitani T, Masuda K, Mimura S, Hirokawa T, Ishiguro H, Kumagai M, et al. Antibacterial effect on microscale rough surface formed by fine particle bombarding. *AMB Express*. 31 janv 2022;12(1):9.
26. Bagherifard S, Hickey DJ, de Luca AC, Malheiro VN, Markaki AE, Guagliano M, et al. The influence of nanostructured features on bacterial adhesion and bone cell functions on severely shot peened 316L stainless steel. *Biomaterials*. déc 2015;73:185-97.
27. Stevenson S, Shaffer JW, Goldberg VM. The Humoral Response to Vascular and Nonvascular Allografts of Bone: *Clinical Orthopaedics and Related Research*. mai 1996;326:86-95.
28. Wagner-Golbs A, Neuber S, Kamlage B, Christiansen N, Bethan B, Rennefahrt U, et al. Effects of Long-Term Storage at -80 °C on the Human Plasma Metabolome. *Metabolites*. mai 2019;9(5):99.
29. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* [Internet]. 2 juin 2014 [cité 24 janv 2022];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00258/abstract>

## Annexe 1

| <b>Staphylococcus aureus</b>                                     |                  |
|--|------------------|
| Antibiogramme par technique en milieu liquide VITEK2 Biomérieux. |                  |
| CMI (mg/l)   |                  |
| Oxacilline   | <b>Résistant</b> |
| Kanamycine   | Sensible         |
| Gentamicine  | Sensible         |
| Erythromycine  | <b>Résistant</b> |
| Clindamycine   | <b>Résistant</b> |
| Quinupristine-Dalfopristine                                      | Sensible         |
| Lévofloxacine  | <b>Résistant</b> |
| Vancomycine  | Sensible         |
| Téicoplanine   | Sensible         |
| Linézolide   | Sensible         |
| Triméthoprim + Sulfamides  | Sensible         |
| Furanes  | Sensible         |
| Tétracycline   | Sensible         |
| Acide Fusidique  | Sensible         |
| Fosfomycine  | Sensible         |
| Rifampicine  | Sensible         |
| Daptomycine  | Sensible         |

| <b>Staphylococcus epidermidis</b>                                |                    |
|--|--------------------|
| Antibiogramme par technique en milieu liquide VITEK2 Biomérieux. |                    |
| CMI (mg/l)   |                    |
| Oxacilline   | <b>Résistant</b>   |
| Kanamycine   | <b>Résistant</b>   |
| Gentamicine  | <b>Résistant</b>   |
| Erythromycine  | <b>Résistant</b>   |
| Clindamycine   | <b>Résistant</b>   |
| Quinupristine-Dalfopristine                                      | <b>Résistant</b>   |
| Lévofloxacine  | <b>Résistant</b>   |
| Vancomycine  | Sensible           |
| Linézolide   | Sensible           |
| Triméthoprim + Sulfamides  | <b>Résistant</b>   |
| Furanes  | Sensible           |
| Tétracycline   | Sensible           |
| Acide Fusidique  | <b>Résistant</b> N |
| Fosfomycine  | Sensible           |
| Rifampicine  | Sensible           |
| Daptomycine  | Sensible           |

| <b>Escherichia coli</b>  |   |
|--|---|
| Antibiogramme par technique en milieu liquide VITEK2 Biomérieux. |   |
| CMI (mg/l)   |   |
| Ampicilline  | <b>Résistant</b>  |
| Amox + Ac. Clavulanique  | Sensible  |
| Ticarilline  | <b>Résistant</b>  |
| Pipéracilline+Tazobactam   | Sensible      2      Technique en milieu liquide par microdilution (Biocentric) |
| Céfoxitine   | Sensible  |
| Céfotaxime   | <b>Résistant</b>  |
| Ceftazidime  | Intermédiaire   |
| Ceftazidime + Avibactam  | Sensible      0.094      Technique en milieu gélosé (E-Test)                    |
| Ertapenem  | Sensible  |
| Imipenem   | Sensible  |
| Meropenem  | Sensible      0.032      Technique en milieu gélosé (E-Test)                    |
| Tobramycine  | <b>Résistant</b>  |
| Amikacine  | Intermédiaire   |
| Gentamicine  | <b>Résistant</b>  |
| Acide nalidixique  | <b>Résistant</b>  |
| Ofloxacine   | <b>Résistant</b>  |
| Ciprofloxacine   | <b>Résistant</b>  |
| Triméthoprim + Sulfamides  | <b>Résistant</b>  |
| Furanes  | Sensible  |

## Annexe 2

### Matériels et méthodes

Selon le même plan expérimental, les 3 souches bactériennes ont été mises en culture sur les 4 types d'os jusqu'à T72h sans aucun lavage intermédiaire (simple rajout de TSB une fois par jour).

### Résultats

Pour *S. aureus* (Fig. 1) :

Il n'y avait pas de différence significative entre les 4 groupes d'os ( $7,83 \pm 0,32$  lg ;  $7,58 \pm 0,31$  lg ;  $7,41 \pm 0,41$  lg et  $7,88 \pm 0,45$  lg UFC pour les groupes os F, C, CT et CO<sub>2</sub>sc respectivement ;  $p = 0,55$ ).

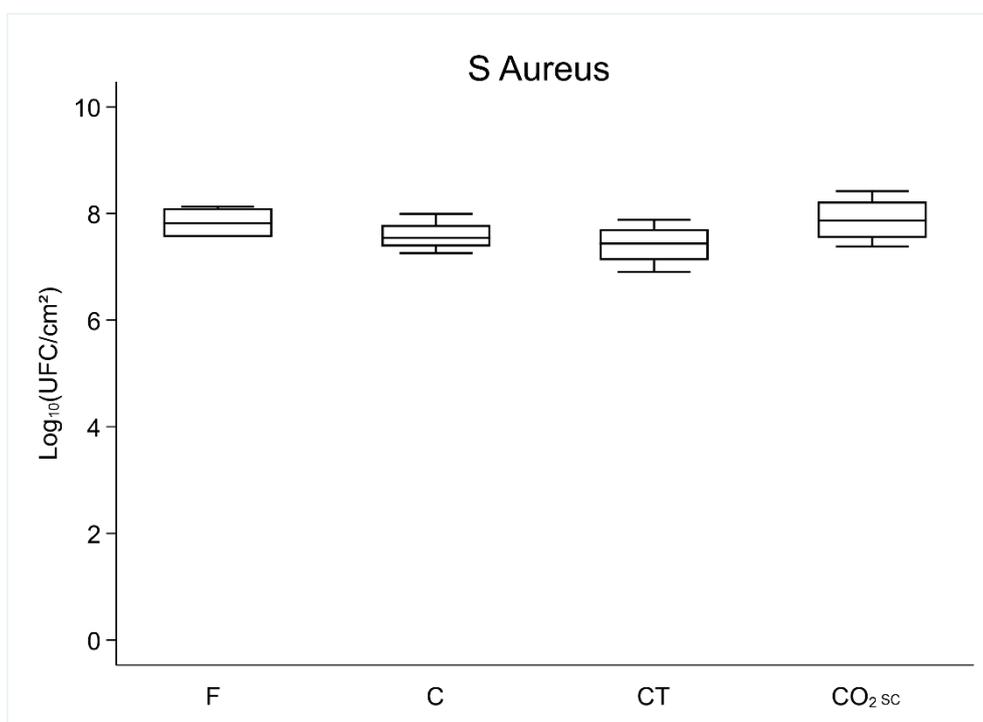


Figure 1 : Nombre d'UFC (lg/cm<sup>2</sup>) pour *S. Aureus* à T72h.

Pour *S. epidermidis* (Fig. 2) :

Le nombre d'UFC était significativement plus faible dans le groupe os CT ( $5,87 \pm 0,19$  lg UFC ;  $p < 0,01$ ) que dans les 2 autres groupes os C et F ( $7,12 \pm 0,19$  lg ; et  $7,59 \pm 0,40$  lg UFC respectivement). Il n'y avait pas de différence significative avec le groupe os CO<sub>2</sub>sc ( $6,39 \pm 0,30$  lg UFC ;  $p = 0,89$ ).

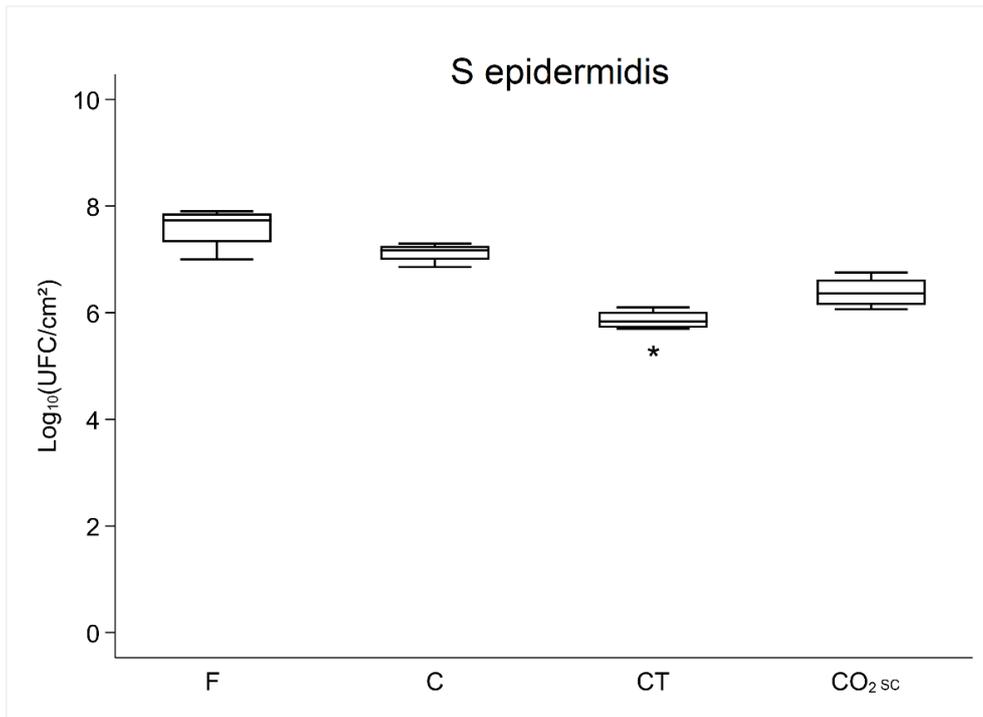


Figure 2 : Nombre d'UFC (lg/cm<sup>2</sup>) pour S. Epidermidis à T72h.

Pour E. coli (Fig. 3) :

Le nombre d'UFC était significativement plus élevé sur l'os C (8,33 +/- 0,31 lg UFC ; p = 0,03) tandis qu'elle était plus faible sur l'os CT (6,46 +/- 0,40 lg UFC ; p = 0,02).

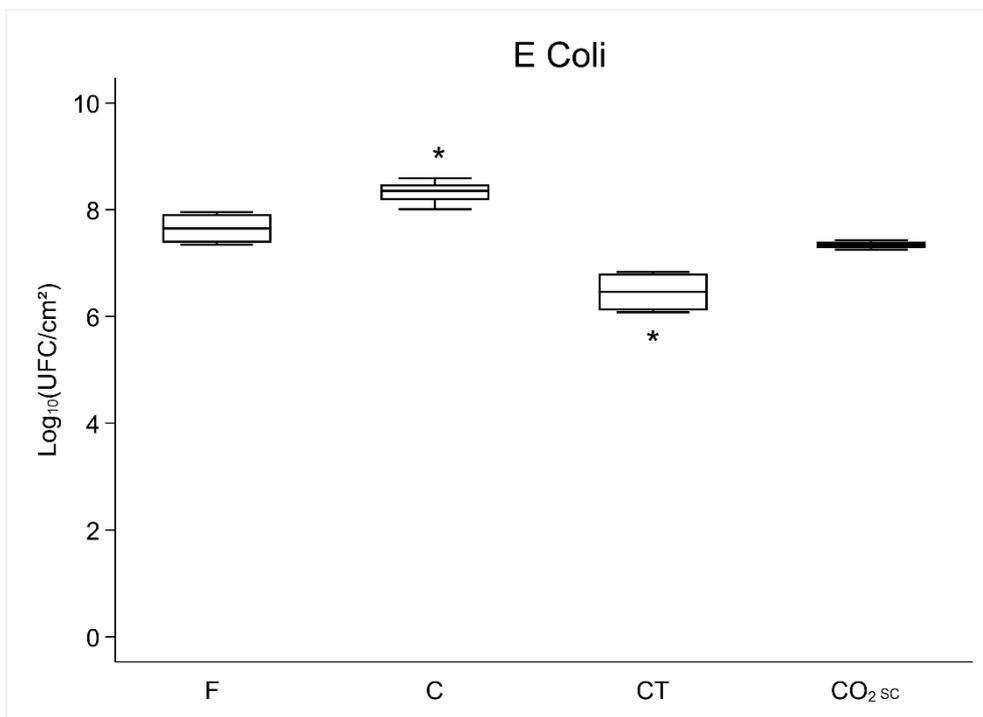


Figure 3 : Nombre d'UFC (lg/cm<sup>2</sup>) pour E. coli à T72h.

## 5. Discussion générale et perspectives

Ce travail fait suite à la thèse de docteur d'université de R. Erivan(1) qui avait réalisé un état des lieux de la disponibilité, de l'utilisation et des traitements des allogreffes tissulaires de l'appareil locomoteur en France.

Après avoir constaté que le « retard français » dans l'utilisation des allogreffes était en grande partie dû à un manque d'offre en greffons, il avait été développé des solutions tel que :

- la standardisation de la technique opératoire de prélèvement et de reconstruction du corps,
- la création d'une équipe chirurgicale d'astreinte dédiée au prélèvement et mobile sur un territoire régional,
- la création d'un consortium national de gestion et distribution des allogreffes de l'appareil locomoteur (incluant les sociétés savantes).
- le développement d'un procédé de traitement innovant basé sur l'utilisation du CO<sub>2</sub>sc sans aucune substance chimique associée afin de faciliter la conservation et la distribution des greffons.

Le but de cette thèse était donc de caractériser l'os traité par ce nouveau procédé d'un point de vue mécanique, structurel et biologique.

Concernant les caractéristiques mécaniques, l'os traité au CO<sub>2</sub>sc était plus rigide, résistant et dur mais moins déformable (donc plus fragile) que l'os congelé. En effet, le module de Young (ou équivalent) était augmenté ce qui est classique sur un os qui a perdu l'essentiel de sa part organique. Les différents paramètres histomorphométriques n'étaient pas significativement modifiés notamment en termes de densité trabéculaire. En MEB, la surface des travées semblait plus rugueuse et les cavités intertrabéculaires plus « vides » témoignant du bon nettoyage du traitement.

Le potentiel ostéogénique, *in vitro*, de l'os traité au CO<sub>2</sub>sc était similaire à celui de l'os congelé. Nous avons surtout pu montrer l'impact négatif sur l'ostéogénèse de la présence de résidus de substances chimiques présentes sur un os traité chimiquement. Ceci confirme notre hypothèse initiale quant au développement d'un nouveau procédé de traitement « vert » des allogreffes de l'appareil locomoteur.

Enfin, les expériences de bactériologie, nous ont permis de s'assurer que ce traitement ne favorisait pas l'adhérence et le développement bactérien par rapport aux autres modes de traitement/conservation de l'os.

Un travail sur la thématique de l'immunologie des allogreffes sera notamment nécessaire comme premier complément à ce travail de thèse.

Actuellement les allogreffes osseuses et tissulaires de l'appareil locomoteur sont majoritairement implantées sans précaution spécifique par rapport à la compatibilité HLA (Human Leukocyte Antigen) entre patient donneur et receveur(2).

Aujourd'hui, 8 à 12% des échecs d'allogreffe sans cause retrouvée (infectieuse ou mécanique) seraient attribués à des problèmes immunologiques. Une méta-analyse rapporte même un taux de 48% de sensibilisation HLA après allogreffe osseuse(3), mais l'impact de cette sensibilisation sur l'ostéointégration reste encore très discuté(2,4).

Les allogreffes sont antigéniques, donc susceptibles de déclencher une réaction de rejet immunitaire, médiée par les cellules immunocompétentes et dirigée contre les antigènes de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité présent à la surface des cellules de la moelle osseuse, du collagène et de la graisse(5-7). Cette réaction a été démontrée de façon directe et indirecte chez l'animal avec une réponse humorale(8) mais aussi cellulaire(6), et chez l'homme avec la détection d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA du greffon(9) et des cellules-T en cas de rejet chronique(10,11). Malgré de nombreux travaux, l'immunologie de l'allogreffe osseuse reste non complètement connue.

L'immunogénicité est partiellement diminuée par la congélation des greffons(12,13), qui entraîne une lyse des cellules de la moelle osseuse. Les procédés de nettoyage chimiques ou physiques comme la chaleur ou l'irradiation ont des effets similaires(14,15), mais ceci n'a pas été étudié pour le CO<sub>2</sub>sc.

Un deuxième travail devra porter sur la réalisation d'expériences similaires (principalement de biomécaniques et de biocompatibilité) sur des allogreffes tendineuses notamment. En effet, ce type de tissus est actuellement le plus demandé dans le domaine des allogreffes de l'appareil locomoteur(16). Les méthodes historiques traditionnelles de conservation comme la lyophilisation et l'irradiation forte dose détérioraient les caractéristiques mécaniques de ces tissus du fait d'une déshydratation trop importante et d'une désorganisation de la trame collagénique(17,18). Une étude récente de Sun et al. sur l'utilisation d'un procédé associant CO<sub>2</sub>sc, irradiation gamma et un détergent tensioactif ionique fort (le sodium lauryl sulfate ou INCI ou SLS) semble être une piste de travail(19).

Enfin, la dernière thématique qui pourrait être développée dans les suites de ce travail porte sur les paramètres d'utilisation du CO<sub>2</sub>sc. En effet, les différents réglages possibles lors de l'utilisation du CO<sub>2</sub> dans sa phase supercritique (température, pression, débit, vitesse de pressurisation et de dépressurisation, durée du traitement, ajout de substance) peuvent modifier ses capacités d'extraction mais aussi d'imprégnation, et sont autant de possibilités d'optimisation et d'innovation des allogreffes tissulaires traitées(20).

### *Références*

1. Erivan R. Evolution, préparation et traitement des allogreffes de l'appareil locomoteur [Internet] [These de doctorat]. Université Clermont Auvergne (2017-2020); 2019. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2019CLFAS007>
2. Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, Hamza A, Panteliadis P, Heliotis M, et al. Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *Expert Opin Biol Ther.* juin 2010;10(6):885-901.
3. Moraschini V, de Almeida DCF, Calasans-Maia MD, Kischinhevsky ICC, Louro RS, Granjeiro JM. Immunological response of allogeneic bone grafting: A systematic review of prospective studies. *J Oral Pathol Med.* mai 2020;49(5):395-403.
4. Ward WG, Gautreaux MD, Lippert DC, Boles C. HLA sensitization and allograft bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res.* août 2008;466(8):1837-48.
5. Friedlaender GE. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res.* avr 1983;(174):58-68.
6. Horowitz MC, Friedlaender GE. Induction of specific T-cell responsiveness to allogeneic bone. *J Bone Joint Surg Am.* sept 1991;73(8):1157-68.
7. VandeVord PJ, Nasser S, Wooley PH. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res.* sept 2005;23(5):1059-64.
8. Muscolo DL, Kawai S, Ray RD. In vitro studies of transplantation antigens present on bone cells in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* août 1977;59(3):342-8.
9. Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW. Studies on the antigenicity of bone. II. Donor-specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts. *J Bone Joint Surg Am.* janv 1984;66(1):107-12.
10. Czitrom AA. The immune response: the afferent arm. *Clin Orthop Relat Res.* mai 1996;(326):11-24.
11. Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW. Advances in the understanding of rejection mechanisms. *Transplant Proc.* févr 1989;21(1 Pt 1):10-3.
12. Friedlaender GE. Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *J Bone Joint Surg Am.* sept 1991;73(8):1119-22.

13. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* avr 1987;69(4):573-82.
14. Burwell RG, Gowland G. Studies in the transplantation of bone, III. The Immune Responses of Lymph Nodes Draining Components of Fresh Homologous Cancellous Bone and Homologous Bone Treated by Different Methods. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume.* févr 1962;44-B(1):131-48.
15. Kitchen AD, Mann GF, Harrison JF, Zuckerman AJ. Effect of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus and human coagulation proteins. *Vox Sang.* 1989;56(4):223-9.
16. Beer AJ, Tauro TM, Redondo ML, Christian DR, Cole BJ, Frank RM. Use of Allografts in Orthopaedic Surgery: Safety, Procurement, Storage, and Outcomes. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine.* 1 déc 2019;7(12):2325967119891435.
17. Smith CW, Young IS, Kearney JN. Mechanical properties of tendons: changes with sterilization and preservation. *J Biomech Eng.* févr 1996;118(1):56-61.
18. Kerboull L, Christel P, Meunier A. [In vitro study of the role of various preservation methods on mechanical properties of allografts of the patellar tendon]. *Chirurgie.* 1991;117(9):751-62.
19. Sun Y, Lovric V, Wang T, Oliver RA, Walsh WR. Effects of SCCO<sub>2</sub>, Gamma Irradiation, and Sodium Dodecyl Sulfate Treatments on the Initial Properties of Tendon Allografts. *Int J Mol Sci.* 25 févr 2020;21(5):E1565.
20. Srinivasan P, Hsieh DJ, Srinivasan P, Hsieh DJ. Supercritical Carbon Dioxide Facilitated Collagen Scaffold Production for Tissue Engineering [Internet]. *Collagen Biomaterials.* IntechOpen; 2022. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/state.item.id>

## 6. Conclusion

Le traitement des allogreffes tissulaires de l'appareil locomoteur par un procédé basé sur l'utilisation du CO<sub>2</sub>sc sans ajout de substance chimique complémentaire est une solution fiable. En effet le CO<sub>2</sub>sc agit comme un solvant « vert » et permet de conserver les caractéristiques mécaniques et de biocompatibilité du tissu, contrairement aux procédés de traitement physico-chimiques habituels.

Par conséquent le CO<sub>2</sub>sc, du fait de ses capacités d'extraction mais aussi d'imprégnation, est une voie de recherche future majeure pour l'optimisation et possiblement à terme la personnalisation des allogreffes tissulaires de l'appareil locomoteur. Néanmoins cela doit aussi s'intégrer dans un projet global qui comprend l'industrialisation du process dans un environnement contrôlé stérile, ainsi que l'établissement au préalable d'un business plan.