

# TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	7
1. PREMIÈRE PARTIE : LES BMPs.....	9
1.1 Historique.....	9
1.2 Biochimie.....	10
1.2.1 La synthèse des BMPs.....	10
1.2.2 Leur structure.....	12
1.2.2.1 Structure d'un monomère.....	13
1.2.2.2 Formation d'un dimère.....	15
1.2.3 Leurs récepteurs.....	18
1.2.3.1 Identification des récepteurs.....	18
1.2.3.2 Affinité.....	19
1.2.3.3 Fixation du ligand.....	20
1.2.3.4 Activation des récepteurs.....	21
1.2.3.5 Modalités de fixation.....	21
1.3 Physiopathologie.....	23
1.3.1 Modifications de la synthèse basale : Le cas de la fracture.....	24
1.3.1.1 La cicatrisation osseuse.....	24
1.3.1.2 Zoom sur les BMPs dans ce contexte.....	26
1.3.2 Voies de signalisation.....	29
1.3.2.1 Les protéines Smads.....	29
1.3.2.1.1 Identification.....	29
1.3.2.1.2 Activation des Smads.....	30
1.3.2.1.3 Leur structure.....	30

1.3.2.1.4	Leurs actions dans le noyau .....	32
1.3.2.2	La voie p38 .....	32
1.3.3	Effets connus .....	34
1.3.3.1	Embryogenèse et organogenèse .....	34
1.3.3.2	Des protéines ostéoinductrices et chondroinductrices .....	36
1.3.4	Voies de régulation.....	38
1.3.4.1	Régulation des taux circulant de BMPs actives .....	39
1.3.4.1.1	Régulation de la synthèse des BMPs .....	39
1.3.4.1.2	Le rôle de la matrice extracellulaire .....	40
1.3.4.1.3	Les inhibiteurs directs des BMPs .....	41
1.3.4.2	Régulation au niveau des récepteurs .....	43
1.3.4.2.1	Régulation des récepteurs .....	43
1.3.4.2.2	Inhibiteurs des récepteurs .....	44
1.3.4.3	Régulation des voies de signalisation .....	45
1.3.4.3.1	La voie des Smads .....	45
1.3.4.3.2	La voie p38 .....	48
2.	DEUXIÈME PARTIE : LES BMPs EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE ORTHOPÉDIQUE.....	49
2.1	Nature des produits utilisables .....	49
2.1.1	Extraction des BMPs naturelles .....	49
2.1.2	Production de recombinant.....	50
2.1.2.1	La technique.....	50
2.1.2.2	Les produits obtenus .....	51
2.1.2.2.1	Caractéristiques générales de ces produits .....	51
2.1.2.2.2	Quelques modifications .....	54
2.2	Leur utilisation en médecine orthopédique vétérinaire .....	55
2.2.1	L'utilisation de supports.....	56

2.2.1.1	Leurs rôles.....	56
2.2.1.2	Leurs caractéristiques générales.....	58
2.2.1.3	Les interactions support/BMPs .....	58
2.2.1.4	La cinétique de libération.....	60
2.2.1.5	Quelques exemples de supports .....	61
2.2.1.5.1	Polymères synthétiques biodégradables .....	61
2.2.1.5.2	Collagène (Bessa <i>et al.</i> , 2008).....	62
2.2.1.5.3	Polymères d'origine naturelle.....	64
2.2.1.5.4	Céramiques (Bessa <i>et al.</i> , 2008).....	65
2.2.1.5.5	Micro et nanoparticules .....	65
2.2.1.5.6	Nouvelles approches (Sykaras et Opperman, 2003).....	66
2.2.2	Bilan des antécédents et indications cliniques .....	66
2.2.2.1	La fracture des os longs .....	66
2.2.2.2	L'arthrodèse intervertébrale.....	69
2.2.2.3	Les réparations dentaires et faciales .....	70
2.2.2.4	La dose .....	71
2.3	Produit vétérinaire disponible : Le Trucient .....	72
2.3.1	Description du produit.....	72
2.3.1.1	Composition du produit .....	72
2.3.1.2	AMM.....	73
2.3.2	Modalités d'utilisation.....	73
	CONCLUSION .....	79
	BIBLIOGRAPHIE .....	81

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié de la synthèse des BMPs.....	12
Figure 2 : Schéma de la structure secondaire de BMP-2 (chez l'homme).....	14
Figure 3 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de BMP-2 .....	17
Figure 4 : Différentes modalités de fixation des BMPs à leurs récepteurs .....	23
Figure 5 : Les étapes de la cicatrisation osseuse suite à une fracture.....	26
Figure 6 : Taux d'ARNm de plusieurs BMPs suite à une fracture .....	28
Figure 7 : Structure des membres de la famille Smad.....	31
Figure 8 : Les différentes voies de signalisation induites par les BMPs.....	33
Figure 9 : Schéma de fixation de noggin sur un dimère de BMPs.....	42
Figure 10 : Schéma de fixation de la follistatine sur un dimère de BMPs.....	43
Figure 11 : Mode d'action des I-Smads au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme et du noyau .....	47
Figure 12 : Comparaison de la cinétique de rétention de rhBMP-2 lorsqu'elle est introduite dans une éponge de collagène ou sans support.....	57

# TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Fixation du ligand à son récepteur .....	20
Tableau 2 : Effets de l'activation ou de l'inhibition de la BMP-2 sur l'expression des BMPs endogènes .....	39
Tableau 3 : Diverses modèles d'expression des BMPs recombiants .....	53
Tableau 4 : Quelques modifications chimiques ou génétiques et leurs conséquences sur des BMPs .....	55

## TABLE DES PHOTOS

Photo 1 : Désinfection des bouchons des flacons .....	74
Photo 2 : Solution de rhBMP-2 reconditionnée .....	75
Photo 3 : Eponge de collagène, juste après imprégnation de la solution de rhBMP-2 .....	76
Photo 4 : Eponges de collagènes 15 minutes après l'imprégnation par la rhBMP-2 .....	77

# INTRODUCTION

Les protéines morphogénétiques de l'os, plus communément appelées Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), sont des facteurs de croissance et font partie de la superfamille des Transforming Growth Factors bêta (TGFβs ou facteurs de croissance transformant bêta en français).

Elles sont découvertes dans les années 60 par Urist lorsque l'implantation ectopique de matrice osseuse déminéralisée induit chez des rats une formation osseuse (Urist *et al.*, 1979 cité par Sykaras et Opperman, 2003).

Elles sont depuis au cœur de nombreuses études qui ont mis en évidence leurs divers rôles depuis la vie embryonnaire jusqu'à la vie post-natale.

Les BMPs sont responsables de la régulation d'un grand nombre de processus qui s'opèrent durant le développement embryonnaire. Elles sont par exemple impliquées dans la régionalisation du mésoderme, le développement des membres et sont nécessaires à la formation de l'os et du cartilage.

Durant la vie post-natale, elles jouent un rôle dans la formation osseuse et cartilagineuse mais possèdent aussi des propriétés proapoptotiques.

Elles ont, *in vivo*, une influence sur de nombreux types cellulaires comme les chondroblastes, les ostéoblastes ou encore les adipocytes.

De nos jours, le génie génétique permet de synthétiser ces molécules en grande quantité, et de les utiliser à des fins thérapeutiques.

Les principales indications thérapeutiques des BMPs sont, en médecine humaine, le traitement des anomalies de cicatrisation lors de fracture des os longs, l'amélioration de la fusion lors d'arthrodèse intervertébrale et les réparations maxillo-faciales (Bessa *et al.*, 2008).

L'objet de cette thèse est de dresser dans un premier temps un bilan des connaissances relatives aux BMPs. Nous porterons un intérêt plus particulier à leurs effets sur les tissus osseux et cartilagineux.

Dans un second temps, nous évoquerons les possibilités qu'elles offrent dans le domaine de la chirurgie vétérinaire orthopédique.



# 1. PREMIÈRE PARTIE : LES BMPs

## 1.1 Historique

De nombreuses expériences ont mené à la découverte de cette famille. Les premières sont exécutées à la fin du XIX ème siècle avec Senn qui démontre, en 1889, que de l'os décalcifié peut être utilisé dans le traitement de l'ostéomyélite (Chiron, 2004).

Durant la première guerre mondiale, des médecins militaires français, Leriche et Policar, expérimentent les effets d'un broyat osseux qu'ils appellent alors « le jus lapifidique » (Chiron, 2004).

Puis, en 1938, Levander met en évidence l'existence d'une substance capable d'activer la formation d'os dans du tissu mésenchymateux non spécifique. Lacroix en 1945 émet l'hypothèse de l'existence d'une molécule capable d'induire la synthèse de tissu osseux et la nomme ostéogénine.

Mais c'est Urist qui est à l'origine de la découverte la plus novatrice (Urist *et al.*, 1979). Sur la base des études qui avaient déjà été menées, il tente de démontrer que ce facteur inducteur de l'ostéogenèse se trouve dans la partie non minérale de la matrice osseuse. Il déminéralise alors du tissu osseux pour en extraire ce qu'il nomme la « matrice osseuse déminéralisée » composée à 96 % de protéine et à 4 % d'acide hyaluronique.

En 1965, il implante de l'os décalcifié prélevé, sur de nombreuses espèces, dans un site intramusculaire et quelques semaines plus tard, il constate, radiographiquement et histologiquement, une néoformation d'os et de cartilage. Ce phénomène est alors attribué à une substance supposée présente dans la matrice osseuse : La Bone Morphogenetic Protein (BMP).

Suite à cette découverte, la BMP est au centre de nombreuses recherches qui mettent en évidence l'existence non pas d'une seule molécule mais d'une famille de protéines ostéogéniques.

Les BMPs sont identifiées comme appartenant à la super famille des Transforming Growth Factors  $\beta$  (TGF $\beta$ ) qui comprennent aussi les Growth Differentiation Factors (GDFs), les activines, les inhibines et les hormones anti Mullerienne.

Aujourd'hui une vingtaine de BMPs sont connues.

La purification des protéines inductrices de l'os ainsi que le clonage moléculaire ont permis ensuite de produire ces molécules en grandes quantité afin de mieux les étudier. Durant les années 80, de nombreuses études *in vitro* ont vu le jour et on laissé place aux études *in vivo* dans les années 90 qui, depuis, fournissent de nombreuses informations sur cette famille de protéines.

De nos jours, des recombinants sont produits par génie génétique et entrent dans certains protocoles curatifs (en cas de fracture par exemple).

## 1.2 **Biochimie**

### 1.2.1 **La synthèse des BMPs**

La synthèse de presque toutes les BMPs passe par la formation d'un pré-pro-peptide. Celui-ci est formé de 3 domaines dont les fonctions diffèrent : une séquence signal, hydrophobe, qui dirige la synthèse vers la voie de sécrétion, une pro-région qui permet le repliement de la protéine avant que celle-ci ne soit sécrétée et un domaine actif.

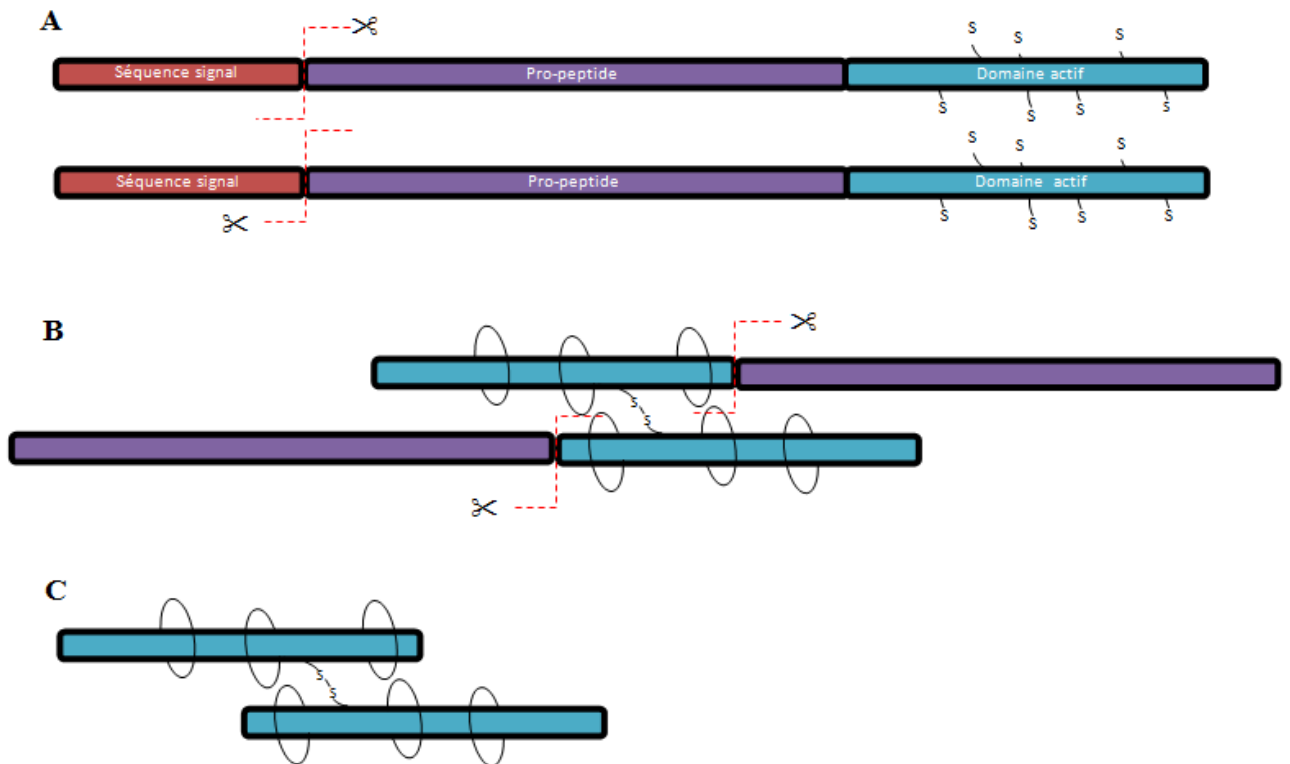
La taille de ce pré-pro-peptide varie selon la nature de la BMP ; celui de la BMP-2 de l'homme est constitué de 19 acides aminés pour la séquence signal, alors que la pro-région en compte 263 et le domaine actif, 114. Le domaine actif comporte sept cystéines (Figure 1.A).

Lors de la transcription, la séquence signal du futur pré-pro-peptide dirige l'ARNm vers le réticulum endoplasmique rugueux où, suite à la traduction, la séquence peptidique correspondant à la séquence signal est alors clivée. Il ne reste donc à ce stade que les séquences peptidiques correspondant à la pro-région et au domaine actif (Figure 1.B).

Ce polypeptide est alors libéré dans le cytoplasme. Il peut rester libre ou bien se dimériser avec un autre polypeptide du même stade *via* un pont disulfure. Il se forme alors un homodimère si les deux dimères sont de la même classe (exemple : BMP-2/BMP-2), ou un hétérodimère dans le cas contraire (exemple : BMP-2/BMP-7).

Une enzyme protéolytique peut alors activer ce dimère en clivant la pro-région, libérant ainsi un dimère de domaines actifs (Figure 1.C). Le dimère est ensuite sécrété à l'extérieur de la cellule (Guimond, 2010).

**Figure 1 : Schéma simplifié de la synthèse des BMPs (Gleyzolle, 2007)**



(A) Deux pré-pro-peptide sont synthétisés séparément dans la cellule. Ils sont constitués d'une séquence signal (en rouge), d'un pro-peptide (en violet) et d'un domaine actif (en bleu) qui contient sept cystéines.

(B) Après coupure de la séquence signal, les deux monomères se lient par un pont disulfure (S-S) pour former un dimère. Les six cystéines forment des ponts intracaténaires.

(C) Une pro-protéine convertase libère les domaines actifs toujours liés et le dimère peut alors être excrété hors de la cellule.

### 1.2.2 Leur structure

La famille des BMPs est aujourd'hui constituée d'une vingtaine de molécules. Elles partagent certaines caractéristiques relatives à leur structure, leur synthèse et leurs effets. Nous étudions ici leur structure et les mécanismes qui permettent leur dimérisation.

### 1.2.2.1 Structure d'un monomère

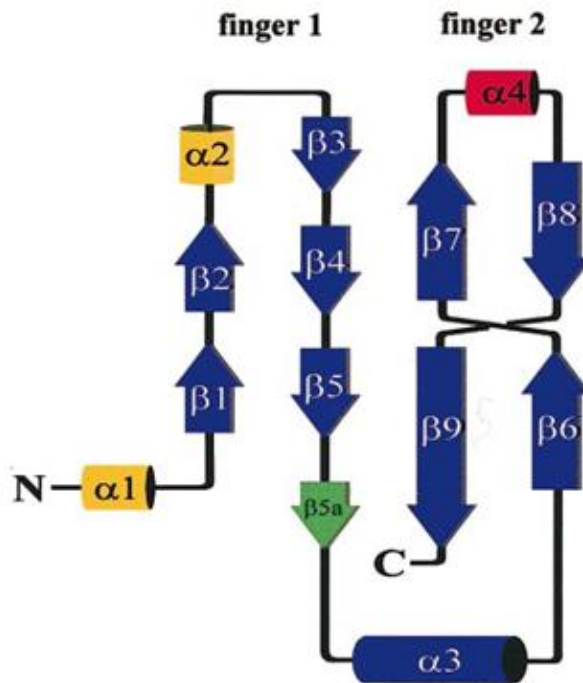
Les BMPs sont des glycoprotéines de bas poids moléculaire non collagéniques. Comme nous l'avons vu précédemment, la forme finale de la BMP-2 est constituée de 114 acides aminés.

Toutes les BMPs présentent au niveau de leur C-terminal une région comportant sept cystéines (Sykaras et Opperman, 2003). Cette caractéristique est commune à tous les membres de la famille des TGF $\beta$ s. Six de ces sept cystéines forment trois ponts disulfures intracaténaux. Ces ponts disulfures sont à l'origine de la formation d'un nœud qui a pour fonction de stabiliser la structure de la protéine (Scheufler et al. 1999). Des nœuds comparables ont été retrouvés dans d'autres familles de facteurs de croissance comme, entre autres, les Transforming Growth Factors, les Vascular Endothelial Growth Factors, les Platelet Derived Growth Factors. Ce nœud est une particularité structurale très bien conservée au cours d'évolution.

Les particularités structurales de cette famille, partagées avec les molécules de la superfamille des TGF $\beta$ s, sont la présence de deux feuillets  $\beta$  antiparallèles, dont le deuxième a une conformation tridimensionnelle en tortillon et une hélice  $\alpha$  perpendiculaire aux brins des feuillets  $\beta$  (Figure 2). Les feuillets  $\beta$  peuvent être subdivisés en neuf brins  $\beta$ .

La topologie de la structure tridimensionnelle de la molécule peut être représentée par une main, les hélices  $\alpha$  représentant le poignet de la main, le nœud de cystines mimant la paume et les feuillets  $\beta$  pour les doigts.

**Figure 2 : Schéma de la structure secondaire de BMP-2 (chez l'homme) (Scheufler *et al.*, 1999)**



Les hélices  $\alpha$  sont schématisées par des cylindres, les feuillets  $\beta$  par des flèches. Les structures partagées par les BMPs et les TGFs sont colorées en bleu. En rouge, sont représentées celles uniques à la BMP-7 et en vert, celles appartenant à la BMP-2.

Il existe néanmoins de nombreuses différences entre les éléments structuraux des TGF $\beta$ s et des BMPs.

La partie N-terminale des BMP-2 et BMP-7 est très peu visible et enfouie au cœur de la protéine. Au contraire, les TGF- $\beta 2$  et TGF- $\beta 3$  exhibent une courte hélice  $\alpha$  ( $\alpha 1$  sur la figure 2) qui est ancrée au noyau de la protéine par un pont de cystine supplémentaire.

De plus, ces mêmes BMPs ne possèdent pas cette petite hélice  $\alpha 2$  que l'on peut observer après le second feuillet  $\beta$  chez les TGF- $\beta$ s. Cela est dû à la délétion d'un acide aminé chez les BMPs qui empêche la formation de cette structure en hélice.

Les BMP-2 et BMP-7 présentent deux particularités structurales, uniquement présentes chez quelques membres de la famille des BMPs.

La BMP-2 possède un petit segment de feuillet  $\beta$  ( $\beta 5a$ ) dans la boucle avant la longue hélice  $\alpha 3$ . Cela lui procure une conformation plus large que les TGF $\beta$ s. A titre de comparaison, la BMP-7 possède le même nombre d'acides aminés dans cette boucle mais cette conformation tridimensionnelle n'est pas retrouvée. En revanche l'hélice  $\alpha 4$  est présente chez la BMP-7 mais pas chez la BMP-2.

Il existe donc des particularités au sein des membres de la famille des BMPs, qui leur confèrent des structures et des fonctions différentes.

Les BMP-3 et 3b (ou bien Growth Differentiation Factor 10) sont de nature très proche puisqu'elles présentent une homologie de séquence d'acides aminés de 83%.

De plus, les BMP-7 et BMP-8, aussi connues sous le nom de protéines ostéogénique 1 et 2 (ou OP1 et OP2) partagent 74% de leur séquence d'acides aminés (Cho *et al.*, 2002).

Nous avons vu précédemment que la forme active des BMPs était des dimères. Nous nous pencherons maintenant sur la structure détaillée d'un homodimère BMP-2/BMP-2. En effet, ce membre de la famille des BMPs a été récemment bien étudié du point de vue de sa structure.

#### 1.2.2.2 Structure d'un dimère

Un homodimère de BMP-2 est formé par l'association antiparallèle de deux BMP-2. Cette liaison se fait par un unique pont disulfure.

Des interactions entre les deux sous-unités ont lieu entre l'hélice  $\alpha 3$  de l'une et les feuillets  $\beta$  de l'autre. Ce même mécanisme de dimérisation a été retrouvé chez d'autres membres de la superfamille des TGF $\beta$ s comme la BMP-7 mais pas chez toutes ces molécules possédant le nœud de cystines.

L'association des deux monomères n'est pas totalement linéaire mais se fait avec un angle d'à peu près 40 degrés. Cela a pour conséquence l'apparition d'une face convexe et d'une face concave.

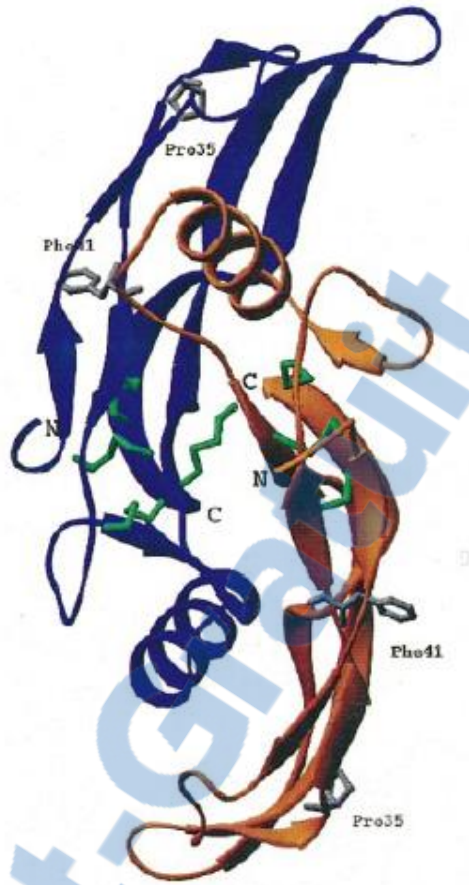
L'étude de dimères de BMP-7, TGF- $\beta$ 2 et TGF-  $\beta$ 3 nous montre que ces protéines ont en commun des noyaux très similaires et par conséquent, ont des angles de dimérisation très proches de celui d'un dimère de BMP-2.

Les interactions entre les deux monomères se font par des noyaux de liaisons hydrophobes. En effet, deux noyaux hydrophobes se forment lors de la liaison entre les deux monomères. Ils sont issus d'interactions entre hélices  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ . Plus précisément, ces liaisons sont six liaisons hydrogènes qui se font entre l'hélice  $\alpha$ 3 et le brin  $\beta$ 8.

Une étude de la séquence d'acides aminés des molécules de la famille des TGF $\beta$ s et des BMPs nous montre que la zone de contact est très bien conservée. En effet, 47% des acides aminés sont identiques dans cette zone chez toutes ces protéines. Ces acides aminés de contact se trouvent dans des structures secondaires rigides mais aussi dans la première boucle plus souple (Scheufler *et al.*, 1999).



**Figure 3 : Structure tridimensionnelle d'un dimère de BMP-2 (Scheufler *et al.*, 1999)**



Les deux sous-unités de la BMP-2 sont représentées en bleu et en orange. Les hélices  $\alpha$  sont présentées sous forme de spirales et les feuilletts  $\beta$  par des flèches. Les ponts disulfures sont représentés par les traits verts. Il est facile d'apercevoir la liaison covalente entre les deux monomères de la BMP-2.

La structure tridimensionnelle de l'homodimère BMP-2 a les dimensions suivantes :  $70 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$ . La dimérisation entraîne la formation d'un noyau hydrophobe entre les deux monomères qui augmente alors la stabilité de la molécule.

### 1.2.3 Leurs récepteurs

La forme active des BMPs se trouve exclusivement à l'extérieur de la cellule. Pour qu'elle puisse avoir un effet sur le fonctionnement des cellules, elle doit se lier à des récepteurs membranaires afin qu'ait lieu une transduction de leur signal.

Comme tout membre de la superfamille des TGF- $\beta$ s, Les BMPs vont se lier avec des récepteurs transmembranaires de type sérine-thréonine kinase.

#### 1.2.3.1 Identification des récepteurs

A l'heure actuelle, on connaît six récepteurs capables de se lier aux BMPs. Nous pouvons les subdiviser en deux classes fonctionnelles, les récepteurs de type I et ceux de type II. En effet, la liaison avec un type ou l'autre de récepteur n'engendre pas les mêmes effets finaux.

Dans la catégorie des récepteurs de type I, nous trouvons deux récepteurs qui ne se lient exclusivement qu'aux BMPs. Ils sont nommés BMPR-IA (BMP Récepteur- IA) et BMPR-IB. Un troisième récepteur, ActR-IA (Activine Récepteur-IA), peut se lier aux BMPs mais aussi à des activines.

Trois récepteurs de type II ont aussi été découverts. Il s'agit de BMPR-II, spécifique des BMPs, et d'ActR-IIA et ActR-IIB pouvant se lier aussi avec d'autres membres de la superfamille des TGF- $\beta$ s (Gleyzolle, 2007).

Les premiers ont une masse variant de 50 à 55 kDa et celle des seconds est de l'ordre de 75 kDa (Sykaras et Opperman, 2003).

Les récepteurs BMPs sont composés de trois parties distinctes : un petit domaine extracellulaire, un domaine intra-membranaire et un domaine intracellulaire qui contient la région sérine/thréonine active (Sykaras et Opperman, 2003).

Les domaines extracellulaires des récepteurs des deux types possèdent de nombreuses cystéines qui sont essentielles à la bonne formation de leur structure tridimensionnelle (Miyazono *et al.*, 2010).

### 1.2.3.2 Affinité

Les récepteurs de type I ont, de manière générale, une très forte affinité pour les BMPs alors que c'est l'inverse pour ceux de type II. C'est une caractéristique propre aux BMPs car les membres de la superfamille des TGF $\beta$ s présente dans leur majorité une affinité plus forte pour les récepteurs de type II.

Mais cette affinité entre ligands et récepteurs dépend de nombreux paramètres.

En effet, l'affinité des BMPs aux récepteurs de type I dépend fortement de la présence des récepteurs de type II à proximité de ceux de type I. Par exemple, la BMP-2 et la BMP-4 se lient préférentiellement à BMPR-IA et BMPR-IB alors que la BMP-6 et la BMP-7 se fixent fortement à ActR-IA et faiblement à BMPR-IB (Miyazono *et al.*, 2010).

De plus, l'affinité d'un même récepteur peut varier en fonction de la forme sous laquelle il se présente. Les BMPR-II peuvent par exemple se présenter sous deux formes. La première possède au niveau du C-terminal une longue queue de 530 acides aminés après un domaine kinase. Elle est la forme exprimée majoritairement, et dans la plupart des types cellulaires. La deuxième forme ne possède pas cette longue queue et semble exprimée dans un nombre restreint de types cellulaires.

Il existe aussi des corécepteurs qui modifient l'affinité des BMPs avec leurs récepteurs et peuvent donc modifier le signal en aval.

La glycosylphosphatidylinositol (GPI) est une protéine qui, en se liant avec les récepteur des BMPs, amplifie le signal des BMP-2 et BMP-4. Cette protéine appartient à la famille des Repulsive Guidance Molecules (RGMs) dont certains membres peuvent aussi se lier avec ces BMPs mais pas la BMP-7. Ces corécepteurs peuvent ainsi jouer de manière spécifique sur l'action de certaines BMPs (Miyazono *et al.*, 2010).



En fonction de leur affinité, les ligands et récepteurs vont donc se lier, selon des mécanismes moléculaires précis.




### 1.2.3.3 Fixation du ligand

L'étude de la liaison entre un dimère de BMP-2 et ses récepteurs a mis en évidence deux sites de fixation.

Le premier épitope, sur la face concave du dimère, est de grande taille et a une grande affinité pour BMPR-IA. Il est constitué d'acides aminés provenant des deux sous-unités BMP-2 (Tableau 1). Le second, de plus petite taille et sur la face convexe du dimère, a une faible affinité pour BMPR-II et provient des acides aminés d'une seule sous-unité.

Ces deux sites sont assez proches. Le premier sert à fixer la molécule à son récepteur de type I alors que le second se lie à son récepteur de type II (Miyazono *et al.*, 2010).

**Tableau 1 : Fixation du ligand à son récepteur (Lin *et al.*, 2007)**

	Modèle prédictif de signalisation	Site de fixation des récepteurs de type I	Site de fixation des récepteurs de type II
TGF- $\beta$		Concave	Convexe
Activin		Concave	Convexe
BMP		Concave	Convexe

Description de différents modes de fixation aux récepteurs de la superfamille des TGF $\beta$ s. Les récepteurs de type I sont représentés en jaune et les récepteurs de type II sont en vert.

Les liaisons entre récepteurs et ligands sont différentes selon les protagonistes de la liaison. Par exemple, la cristallisation du complexe BMP-2 avec son récepteur BMPR-IA a permis d'identifier les points de contact entre le ligand BMP et les récepteurs de type I. Ce sont deux acides aminés qui sont mis en jeu : Leu51 et Asp53 (Brown *et al.*, 2005).

En revanche, le rôle des liaisons non covalentes de type hydrogène, entre autres, est crucial. Ces liaisons permettent la stabilité des complexes ligands/récepteurs et sont à l'origine de leur affinité (Saremba *et al.*, 2007).

#### 1.2.3.4 Activation des récepteurs

Le domaine intracellulaire des récepteurs de type I est constitué d'une zone très riche en glycines et en sérines (domaine GS), située au niveau du N-terminal dans le domaine sérine-thréonine kinase (Miyazono *et al.*, 2010).

Une fois le ligand sur son récepteur de type I, le domaine GS de ce dernier est phosphorylé par un récepteur de type II. C'est une étape cruciale de la transduction du signal par les récepteurs sérine-thréonine kinase.

Au sein de leur domaine kinase, les récepteurs de type I possèdent une boucle d'acides aminés qui fait protrusion et leur permet d'interagir avec des protéines de régulation comme les Smads.

#### 1.2.3.5 Modalités de fixation

En l'absence de stimulation par leurs ligands, les homodimères et hétérodimères de récepteurs sont très peu présents à la surface des cellules. En revanche, la fixation d'un ligand augmente l'oligomérisation de ces récepteurs, ce qui a pour conséquence de modifier leur conformation (Miyazono *et al.*, 2010).

A la surface de la cellule, ces récepteurs peuvent être seuls ou sous forme de complexes hétéro ou homo-dimérique. Nous pouvons ici comprendre qu'en fonction du type de récepteurs que la cellule exprime à sa surface et le type d'association entre ces mêmes récepteurs, les conséquences pour cette cellule seront différentes, y compris pour une même BMP (Gleyzolle, 2007).

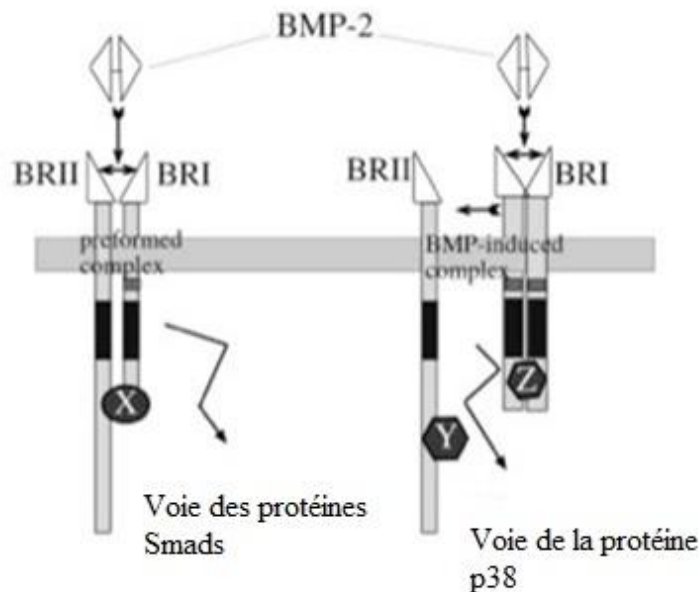
Comme nous l'avons vu ci-dessus, l'activation du signal BMP se fait par l'intermédiaire d'un dimère de protéines. Pour que ce signal soit transmis, chaque BMP doit être liée à au moins un récepteur de type I et un récepteur de type II.

Ainsi, lors de l'activation du signal BMP, deux scénarios peuvent apparaître (Figure 4).

- Un dimère lié au préalable à des récepteurs de grande affinité (BMPR-1A ou BMPR-1B) recrute des récepteurs de type II pour former un complexe hétéro-oligomérique. Ce scénario implique par la suite la voie de signalisation p38.
- Un dimère se lie à un complexe hétéro-oligomérique préformé, constitué de récepteurs de type I et II. C'est la voie de signalisation des Smads qui sera alors activée.

Nous détaillerons par la suite ces deux voies de signalisation.

**Figure 4 : Différentes modalités de fixation des BMPs à leurs récepteurs (Gleyzolle, 2007)**



A gauche, la BMP se fixe à un complexe de récepteurs au moins constitué d'un récepteur de type I et un récepteur de type II. La voie des Smads est engagée.

A droite, la BMP se fixe à un ou plusieurs récepteurs de type I puis un récepteur de type II est recruté ce qui entraîne le déclenchement de la voie p38.

### 1.3 Physiopathologie

Les BMPs jouent un rôle important tout au long de la vie des individus. En effet, ces protéines ont une importance considérable lors de l'embryogenèse et l'organogenèse puis pendant la période adulte (Winnier *et al.*, 1995).

Elles font partie de la grande famille des protéines ostéoinductrices qui, secrétées par de nombreux types de cellules, agissent en association avec d'autres familles comme les Fibroblast Growth Factors (FGFs) ou les Insulin Growth Factors (IGFs).

Ces protéines sont synthétisées de manière constitutive et peuvent être stockées. En cas de besoin, les organismes peuvent puiser dans les stocks ou en modifier la synthèse basale.

Dans notre étude, nous focaliserons notre attention sur les impacts des BMPs dans le domaine de l'orthopédie vétérinaire et donc nous discuterons majoritairement leurs effets sur les tissus osseux et cartilagineux.

Il est aujourd'hui prouvé chez l'homme que l'expression physiologique des BMPs est différente en fonction des tissus et plus particulièrement concernant l'os de membrane et l'os endochondral (Gleyzolle, 2007).

En effet, les BMP-3, 4, 7 et 8 sont statistiquement plus exprimées dans l'os membranaire alors que les BMP-2 et 6 sont préférentiellement exprimées dans l'os enchondral. De plus, les BMPs les plus exprimées, quelque soit le tissu, sont les BMP-2, 5 et 6.

### 1.3.1 **Modifications de la synthèse basale : le cas de la fracture**

Les BMPs sont synthétisées et secrétées de manière permanente dans les organismes. Néanmoins, certaines situations mènent à des variations des taux circulants de BMPs.

Nous étudierons ces modifications au travers de l'exemple de la fracture osseuse car il permet de les mettre en évidence dans un contexte très fréquent en médecine vétérinaire orthopédique.

#### 1.3.1.1 La cicatrisation osseuse

La fracture de l'os est à l'origine de nombreux dégâts au niveau du fût osseux en lui-même mais aussi des tissus mous environnant. Lors de la fracture, la rupture des vaisseaux osseux est à l'origine d'un hématome qui se forme presque instantanément. Le traumatisme des tissus mous peut aussi entraîner des saignements.



Tous ces saignements constituent l'hématome fracturaire.

Cet hématome est essentiel au bon déroulement du processus de la cicatrisation par deuxième intention dont il est la base. Il est le support des cellules qui vont coloniser le site et le pourvoir en molécules pro-inflammatoires.

Nous décrivons dans ce qui suit la cicatrisation de l'os par seconde intention (cicatrisation physiologique) :

La phase inflammatoire débute au moment du traumatisme et se termine approximativement trois semaines plus tard.

Elle constitue une phase de détersion qui permet le nettoyage du site avant qu'une réparation y ait lieu.

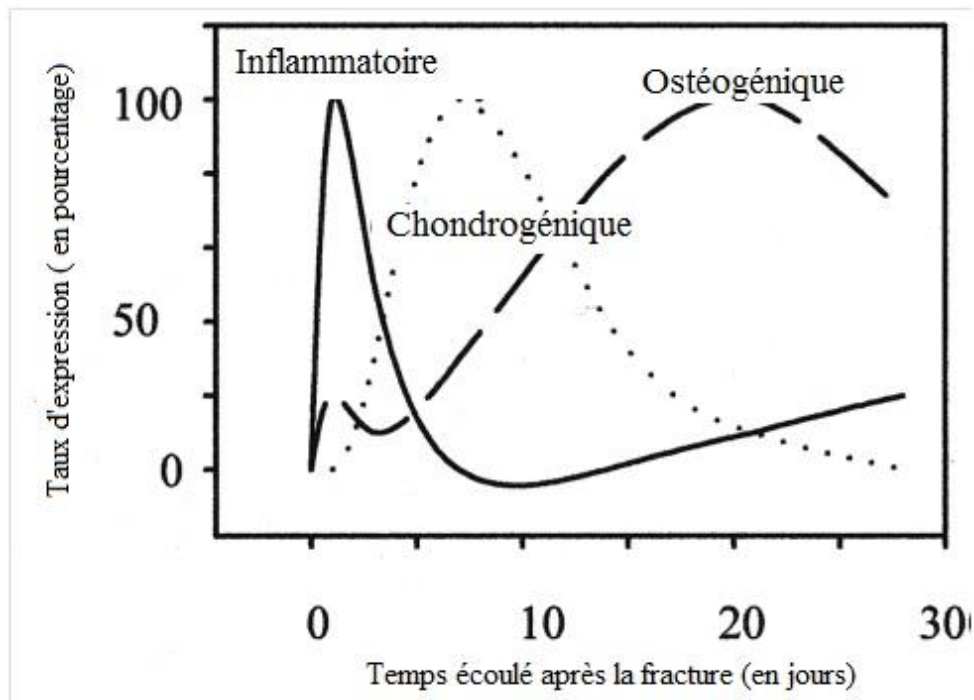
La phase d'angiogenèse, concomitante à la précédente, correspond au moment de néo-vascularisation du site fracturaire. Cela s'accompagne d'un afflux de cellules mésenchymateuses.

Vient ensuite la phase de réparation durant laquelle un cal fibreux remplace l'hématome. En fonction des conditions locales (stabilité, taux d'oxygène, etc...), il est remplacé par un cal fibro-cartilagineux (qui se transforme peu à peu en cal osseux), ou directement en cal osseux.

Ce cal est formé d'os primaire et se transforme progressivement en os lamellaire durant la phase de remodelage (Gleyzolle, 2007).

Du point de vue de la formation d'os, on peut simplifier en considérant trois phases (figure 5) : Une phase inflammatoire, une phase chondrogénique et une phase ostéogénique (Cho *et al.*, 2002).

**Figure 5 : Les étapes de la cicatrisation osseuse suite à une fracture (Cho *et al.*, 2002)**



Le graphique représente la quantité d'expression d'ARN messager de cytokines pro-inflammatoires en fonction du temps, suite à une fracture.

Tout ce processus est le résultat d'événements cellulaires et moléculaires qui agitent le site de la fracture.

Nous nous focaliserons maintenant sur les effets d'un tel traumatisme sur la famille des BMPs.

### 1.3.1.2 Évolution des taux de BMPs dans ce contexte

L'étude menée par Cho et son équipe en 2002 met en évidence la présence d'ARNm de différents membres de la famille des BMPs dans la zone de fracture (Cho *et al.*, 2002), mais ne nous révèle pas la nature des cellules qui synthétisent ces ARN (Figure 6).

Le premier gène de la famille des BMPs à être exprimé après une fracture est celui de la BMP-2. Son mode de synthèse suit une cinétique diphasique avec un pic précoce puis une seconde augmentation quelques jours après le traumatisme.

D'autre part, la BMP-2 est fortement exprimée tout de suite après la fracture, lorsque les cellules mésenchymateuses arrivent sur le site à réparer, et que la chondrogenèse démarre.

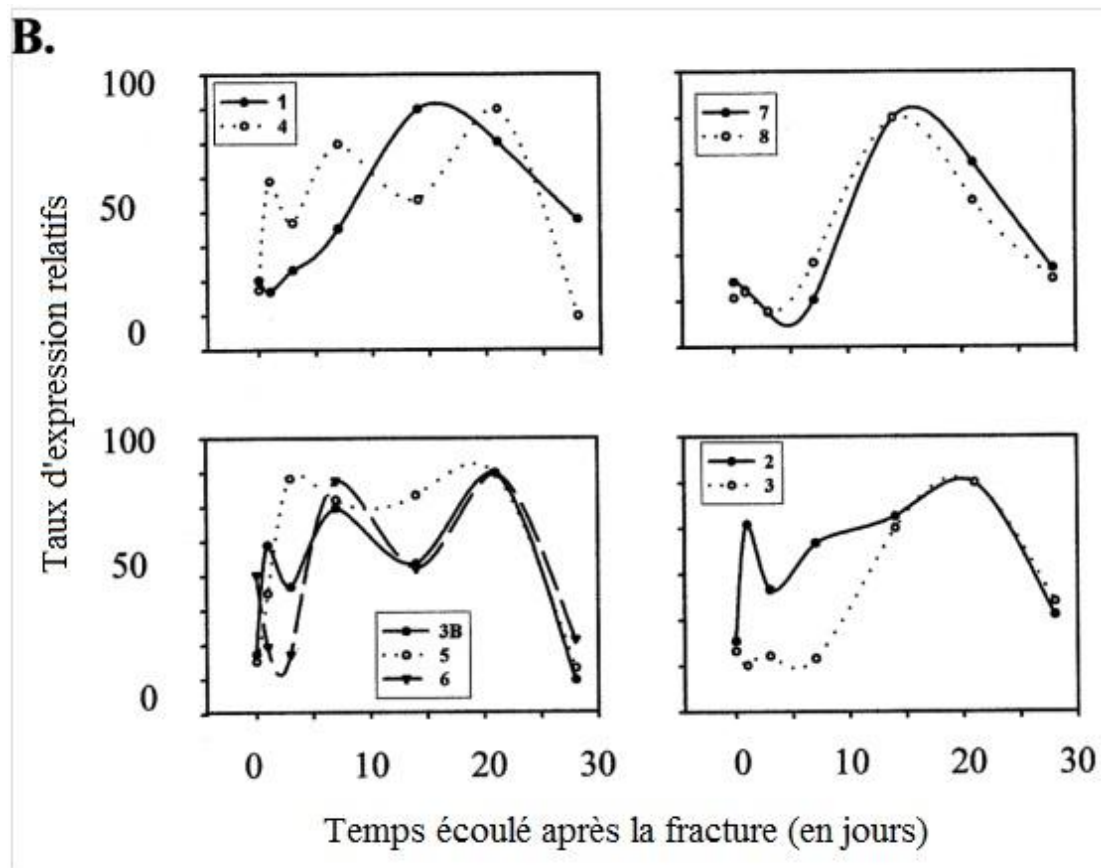
Les expressions de BMP-3, 4, 7 et 8 sont restreintes à la phase la plus active de l'ostéogenèse, c'est-à-dire entre les jours 14 et 21.

Les BMP-5 et 6 quant à elles ne subissent pas de grande modification de leur taux de synthèse et sont constitutivement exprimées tout au long du processus de réparation.

Les forts taux de BMP-5 et 6 semblent nous informer que ces protéines jouent un rôle important dans la condensation des cellules mésenchymateuses, la progression endochondrale et la stimulation de la maturation des chondrocytes.

Même si le rôle des BMP-7 et 8 n'est pas encore complètement compris, il est intéressant de noter que leur expression est assez similaire, très restreinte à la période ostéogénique de réparation de la fracture, au moment où la formation d'os est maximale et la résorption du cartilage a lieu.

Figure 6 : Taux d'ARNm de plusieurs BMPs suite à une fracture (Cho *et al.*, 2002)



Une autre étude menée par Rauch montre que suite à la fracture, les expressions des BMP-2, 4 et 7 sont rapidement induites dans les cellules près du périoste et semblent être limitées pratiquement qu'aux cellules immatures (Rauch *et al.*, 2000).

Néanmoins, l'expression des BMP-2 et 4 diminue durant la phase de consolidation de l'os. Il apparaît cependant que la distraction artificielle d'une fracture, laissant ainsi un espace entre les 2 fûts osseux, entraîne le maintien d'un taux élevé de ces mêmes BMPs. Ces résultats suggèrent fortement que la production de ces BMPs est directement ou indirectement liée au stimulus mécanique engendré par une distraction.

Comme confirmé dans certaines études, l'expression des BMPs est importante avant l'apparition de signes radiologiques et histologiques mettant en évidence une néoformation d'os. Ainsi, nous pouvons observer que les BMPs jouent un rôle précurseur dans la formation d'os.

## 1.3.2 Voies de signalisation

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs voies de signalisation peuvent être initiées suite à la liaison d'une BMP à son récepteur. Les deux voies majeures sont celles des protéines Smads et la voie de la protéine p38.

### 1.3.2.1 Les protéines Smads

#### 1.3.2.1.1 Identification

Le gène MAD (Mother Against Decapentaplegic) a été identifié chez *Drosophila melanogaster* et code pour une protéine de la famille des TGF $\beta$ . Ce même gène a été retrouvé chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et porte le nom de gène SMA (Spinal Muscular Atrophy). Les protéines Smads, dont le nom est une contraction de Sma et de Mad, ont initialement été identifiées comme des facteurs de transcription de gènes réprimant les mutations de MAD et SMA.

Il existe 8 membres de la famille des Smads (Smad-1 à Smad-8) chez les vertébrés. Ces protéines, relai majeur de la superfamille TGF $\beta$ /Activine/BMP, ont été préservées à travers l'évolution (Gleyzolle, 2007).

Nous pouvons séparer les membres de cette famille en 3 catégories fonctionnelles ; les Smads activées par les récepteurs (R-smads), composés de Smad-1, 5 et 8, les Smads cofacteurs ou Co-Smads dont seul Smad-4 a été isolée chez les mammifères et enfin les I-Smads (smad-6 et 7) qui inhibent le signal de la super famille des TGF $\beta$ s en empêchant l'activation des R-smad et des Co-smad.

#### 1.3.2.1.2 Activation des Smads

Après liaison entre la protéine BMP et son complexe de récepteurs, le récepteur de type I se trouve phosphorylé par le récepteur de type II.

La fixation transitoire d'une R-Smad entraîne sa phosphorylation par le récepteur de type I.

Cette R-Smad est alors relâchée dans le cytosol et forme un homo- ou hétéro-oligomère avec d'autres R-smad ou des Co-smad.

Ces complexes peuvent alors traverser la membrane du noyau cellulaire et agir en tant que facteurs de transcription en se liant directement à l'ADN ou en interagissant avec d'autres facteurs (Nohea *et al.*, 2003).

#### 1.3.2.1.3 Structure des Smads

Les structures des Smads-1, 5 et 8 sont très similaires et leurs différences fonctionnelles ne sont pas connues.

Les Smads ont des régions C- et N-terminal très conservées (Figure 7). On les nomme Mad homology 1 et 2 (MH1 et MH2). Elles sont reliées par une région dont la nature est très variable.

Le domaine MH2 est présent chez toutes les Smads alors que le domaine MH1 est conservé uniquement chez les R-Smads et les Co-Smads.

En revanche, les I-Smads ont une région N-terminal très divergente des autres membres de cette famille (Miyazono *et al.*, 2010).

Le domaine MH2 a de nombreuses fonctions essentielles à la molécule. En effet, il est la zone d'interactions avec les récepteurs, de formation d'oligomères avec d'autres Smads, de liaison

avec des protéines ligands de l'ADN et est responsable de l'activation de transcription de nombreux gènes cibles.

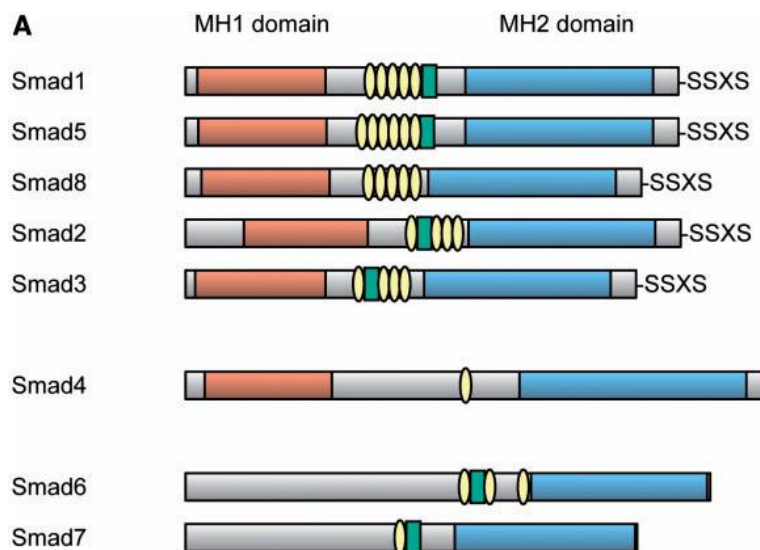
Le domaine MH1 est responsable de la translocation au sein du noyau, de la liaison avec l'ADN *via* des protéines se liant à l'ADN, et de la répression des effets du domaine MH2.

Les R-Smads possèdent une région caractéristique à leur C-terminal dont la séquence d'acides aminés est sérine-sérine-X-sérine. C'est le site de phosphorylation de ces molécules (par les récepteurs de type I).

Ces dernières sont ancrées à la membrane plasmique par des interactions avec des protéines du cytoplasme.

Lorsque les Smads ne sont pas activées, les domaines MH1 et MH2 sont physiquement liés et ils inhibent donc mutuellement leurs effets. La phosphorylation du motif Serine-Sérine-X-Sérine rompt cette liaison et les Smads peuvent alors former des complexes protéiques.

**Figure 7 : Structure des membres de la famille Smad (Miyazono *et al.*, 2010)**



Les R-Smads sont les cinq premières molécules puis la Co-Smad et enfin les deux I-Smads. Le domaine MH1 est représenté en rouge et le domaine MH2, en bleu. Le domaine MH1 est conservé chez les R-Smads et Co-Smad mais est absent chez les I-Smads.

#### 1.3.2.1.4 Actions des Smads dans le noyau

Les Smads agissent dans le noyau par l'intermédiaire de molécules dont l'affinité pour l'ADN est grande. Les régions spécifiques des R-Smads sont celles riches en nucléotides G et C (Miyazono *et al.*, 2010).

Il est montré que les Smads ne possèdent que peu de sites de liaisons avec l'ADN ce qui ne leur permet pas ou peu d'agir directement sur l'ADN lui-même. Des protéines sont donc nécessaires pour créer et stabiliser des liens entre les Smads et l'ADN, permettant ainsi leur action.

#### 1.3.2.2 La voie de la protéine p38

La protéine p38 et une protéine kinase, plus particulièrement une MAP kinase, qui est fortement synthétisée lors de stress cellulaire et de stimulation par des protéines de l'inflammation comme des cytokines. Elle joue un rôle dans la prolifération cellulaire, leur différenciation, la régulation de la transcription de certains gènes et ont un effet sur l'apoptose cellulaire.

Elle est activée par sa phosphorylation qui peut se faire par autophosphorylation ou bien par le complexe TAK1/TAB1.

TAK1 (TGF $\beta$  activated kinase 1) est une MAP kinase kinase kinase, facteur de transcription de nombreux gènes et qui a une action sur l'apoptose. C'est un relais de la transduction du signal des BMPs.

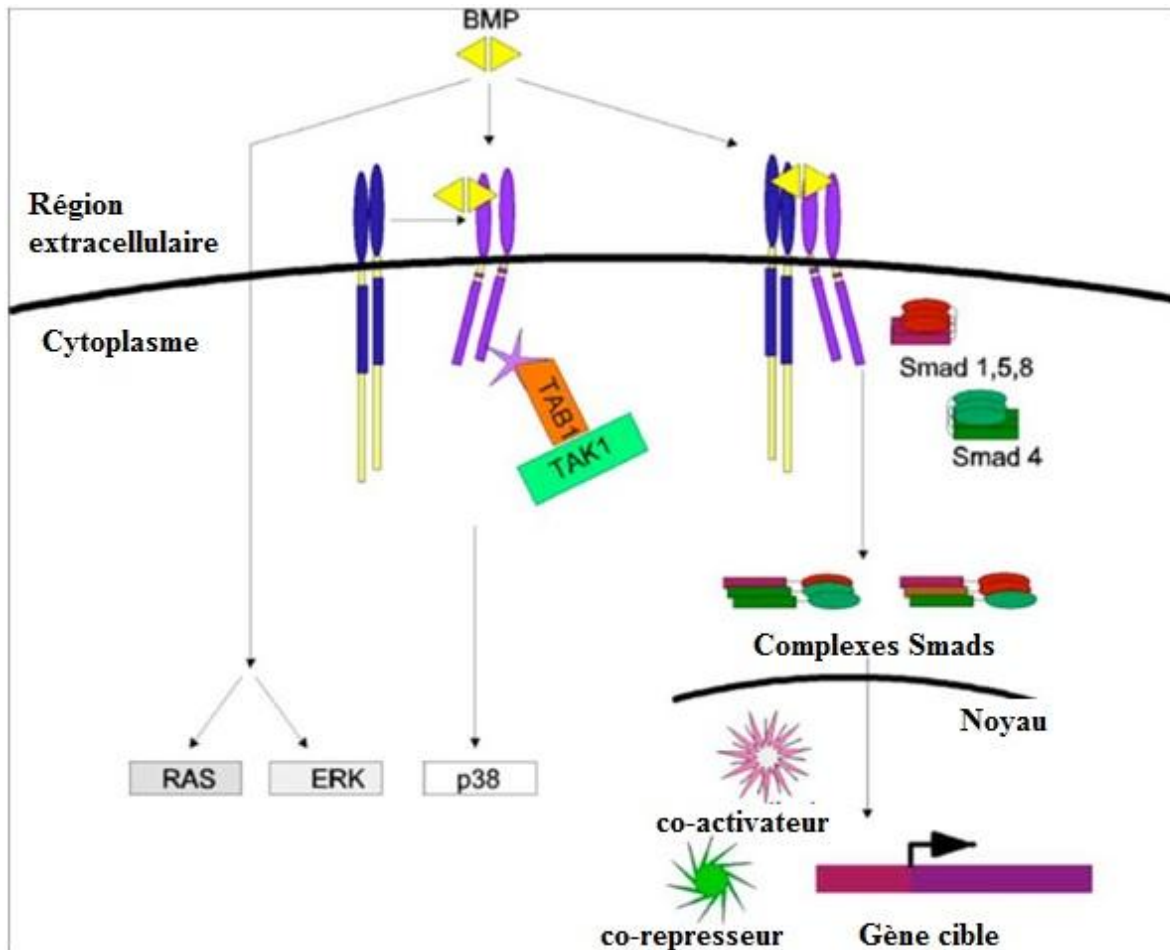
TAB1 (Tak Binding Protein1) est l'une des protéines régulatrice de TAK1. Son extrémité C-terminale est la zone d'activation de TAK1 et elle peut inhiber l'action des TGF $\beta$ s en tant



qu'inhibiteur compétitif grâce à son extrémité N-terminale. De plus, lorsqu'elle se lie avec TAK1, elle peut activer p38 (Gleyzolle, 2007).

Un bilan des différentes voies de signalisation des BMPs est représenté par la figure 8.

**Figure 8 : Les différentes voies de signalisation induites par les BMPs (Gleyzolle, 2007)**



Dans un cas de figure, la BMP se lie avec un complexe de récepteurs de type I et II. C'est la voie Smad qui est activée. Des R-Smads peuvent alors se fixer aux récepteurs de type I et y être activés. Ils forment ensuite dans le cytosol des complexes de Smads avec des Co-Smads et peuvent ensuite être transloqués dans le noyau pour interagir avec l'ADN directement ou par l'intermédiaire d'autres molécules. Dans un autre cas, la BMP se fixe à des récepteurs de type I puis des récepteurs de type II sont alors recrutés ce qui active la voie p38 par l'intermédiaire de l'activation du complexe protéique TAB1/TAK1.

### 1.3.3 Effets connus des BMPs

La formation de l'os peut se faire de différentes manières. L'ossification intramembranaire, directe, a lieu au cours de l'embryogenèse et l'ossification endochondrale, indirecte, est le processus *via* lequel les os longs grandissent, impliquant la formation d'un cartilage de conjugaison qui s'ossifie progressivement, ceci après pénétration d'une artère au sein de la maquette cartilagineuse pré-osseuse.

Dans les deux cas, la formation d'os et de cartilage est à l'origine de nombreuses différenciations cellulaires dans les lignées des ostéoblastes et des chondroblastes.

Nous allons maintenant nous pencher sur les rôles des BMPs durant la vie des individus en nous focalisant plus particulièrement sur leurs effets concernant la mise en place des tissus osseux et cartilagineux.

#### 1.3.3.1 Embryogenèse et organogenèse

Les BMPs jouent un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse et de l'organogenèse.

En effet, il est par exemple montré que la BMP-4 est nécessaire au bon déroulement de la gastrulation. Sans cette protéine, l'embryogenèse est arrêtée ; les embryons mutants pour le gène BMP-4 ne survivent pas à cette étape de leur développement et présentent tous un mésoderme très peu développé, voire absent (Winnier *et al.*, 1995).

Il est aussi maintenant démontré qu'en l'absence de BMP-2 ou 4, le développement embryonnaire des souris est stoppé au stade gastrula (Leboy, 2006). Ces deux protéines déterminent l'axe dorso-ventral et les BMPs sont aussi impliquées dans la formation du tissu nerveux.

En effet, la formation des plaques neurales se fait dans un environnement à faible concentration en ces protéines alors que c'est le contraire pour la formation de l'ectoderme non neural.

Nous voyons ici apparaître la notion de gradient qui est essentielle au bon déroulement du développement de l'embryon. Ce gradient est possible par une modulation de la synthèse des BMPs, mais aussi par un contrôle de la concentration de tout type d'intermédiaire au signal (Récepteurs, Smads ou inhibiteurs comme par exemple les noggins et chordins).

Aussi, lors de la formation des membres, c'est le gradient des BMPs qui va réguler la prolifération puis la différenciation des chondrocytes et l'ossification endochondrale.

Pour exemple, les BMP-2, BMP-3 et BMP-6 sont en concentration très élevée dans le périoste alors que leur concentration est très faible dans les zones du cartilage le plus distal (Macias *et al.*, 1997).

C'est d'ailleurs dans ces zones que d'autres BMPs jouent un rôle essentiel pour la formation des articulations.

La BMP-2 en particulier a ici un rôle apoptotique, ce qui permet la formation des espaces articulaires. Une étude montre que les BMP-2, 4 et 7 sont fortement exprimées dans les cellules embryonnaires mésodermiques du futur espace interdigité.

Si le signal de ces BMPs est inhibé, les embryons développeront des pattes palmées.

Ganan démontre aussi en 1996 que l'apport exogène de BMP-4 provoque l'apoptose de certaines cellules mésodermiques dans la région interdigitée. Cette observation a par la suite été étendue à la BMP-2 et la BMP-7 (Ganan *et al.*, 1996).

### 1.3.3.2 Des protéines ostéoinductrices et chondroinductrices

Certaines observations ont poussé à rechercher le ou les rôles des BMPs dans la formation des tissus osseux et cartilagineux.

En effet, des souris mutantes pour les gènes de BMP-2 présentent des fractures spontanées qui ne guérissent pas (Edgar *et al.*, 2007).

D'autres études ont par la suite montré que la plupart des BMPs peuvent stimuler la synthèse des cellules impliquées dans la formation d'os et de cartilage (Rauch *et al.*, 2000) et peuvent aussi induire la différenciation de cellules précurseurs mésenchymateuses en différents types cellulaires, en particulier les chondroblastes et les ostéoblastes (Sykaras et Opperman, 2003). Elles sont donc ostéoinductrices et chondroinductrices car elles ont la capacité d'induire la formation de tissus osseux et cartilagineux à partir de cellules indifférenciées.

La BMP-1 oriente ces progéniteurs du stroma de la moelle osseuse vers un phénotype ostéoblastique.

De nombreuses études mettent en évidence la présence d'ARNm de BMP-4 dans les cellules du périoste proche du site de fracture, en particulier dans les cellules souches osseuse. Cette ARNm n'est présent que de façon transitoire. En effet, nous pouvons quantifier l'intensité d'expression des BMPs par immuno-coloration et il apparaît que les BMP-2 et 4 sont très fortement exprimées dans les cellules du cambium (l'une des couches du périoste) juste après que la fracture ait lieu, puis très exprimées dans les ostéoblastes des nouveaux trabécules de l'os. Les taux des BMP-2 et BMP-4 diminuent ensuite lorsque l'os se transforme en os lamellaire (Onishi *et al.*, 1998).

Ces BMPs ont de plus la possibilité d'agir sur l'ossification endochondrale et l'ossification intra membranaire.

Il a été prouvé que la BMP-3 peut induire une ossification endochondrale lorsqu'elle est injectée en sous-cutané chez le rat. Elle a aussi le pouvoir de stimuler, *in vitro*, l'expression des phénotypes ostéogénique et chondrogénique dans les ostéoblastes de la calotte crânienne

chez le rat au stade fœtal, et dans les chondrocytes du lapin. Il semble donc que cette BMP joue un rôle dans le processus de chondrogenèse et d'ostéogenèse (Cho *et al.*, 2002).

Lors de la cicatrisation après une fracture, les BMP-2 et 4 agissent sur les cellules précurseurs afin qu'elles deviennent des chondroblastes et qu'elles secrètent des protéines nécessaires à la formation du premier tissu osseux, l'os réticulaire. Lorsque l'os réticulaire est remplacé par l'os lamellaire, l'expression des BMPs est significativement diminuée. De même, la BMP-4 est moins exprimée dans les cellules différenciées lors de distraction osseuse effectuée artificiellement pour des besoins expérimentaux. Les BMP-1, 2, 4 et 6 sont exprimées par les ostéoblastes avant la formation des nodules d'os déminéralisé.

Bien que les TGFβs ne puissent pas induire de formation ectopique d'os, ils interviennent tout de même dans la guérison de l'os. En effet, ils peuvent former des hétérodimères avec les BMPs et ainsi potentialiser leur effet, surtout durant les premières phases de la réparation osseuse (Sykaras et Opperman, 2003).

Il est aussi prouvé aujourd'hui (Miyazono *et al.*, 2010) que si la majorité des BMP (2, 4, 7, 9 et 10) induisent la formation d'os et de cartilage *in vivo*, d'autres membres de la super famille des TGFβs comme les GDF-5, 6 et 7 induisent la formation de cartilage et de tendons mais pas de tissu osseux.

Il est difficile de connaître aujourd'hui toutes les actions des BMPs car ces protéines agissent sur de nombreux types cellulaires. Cela va des fibroblastes aux cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif ou à la lignée des cellules astrogliales et bien d'autres encore.

Les cellules stromales de la moelle osseuse sont une importante source de progéniteurs mésenchymateux pluripotents et sont capables à ce titre de se différencier en plusieurs lignées cellulaires en fonction des conditions de leur différenciation.

Mais les effets des BMPs ne sont pas les mêmes en fonction de la dose à laquelle ils sont présents. Elles peuvent en effet induire un chimiotactisme ou stimuler la prolifération cellulaire et ont aussi un effet mitogène puissant.

Les cellules stromales de la moelle peuvent orienter leur différenciation vers la lignée des ostéoblastes ou bien des adipocytes. Des études ont démontré que le taux de BMPs joue un rôle sur cette différenciation (Sykaras et Opperman, 2003).

En effet, des taux bas de BMPs stimulent la différenciation vers la lignée adipocytaire alors que des forts taux de BMPs orientent plutôt vers les lignées ostéoblastique et chondrogénique (ces deux dernières provenant d'un précurseur commun).

Nous savons aussi qu'à forte dose, les BMPs induisent la formation d'os plus rapidement qu'à faible dose car le cartilage est remplacé plus rapidement par de l'os organisé.

Dans les cellules de la lignée des chondrocytes, de faibles concentrations en BMP-2 (50 ng/mL) sont à l'origine d'une surexpression du gène du collagène II, fortement exprimé dans le tissu cartilagineux alors que des concentrations plus élevées (100-400 ng/mL) inhibent l'expression du collagène II et augmentent celle de l'ostéocalcine, caractéristique du tissu osseux (Sykaras et Opperman, 2003).

Parmi tous ces résultats, nous pouvons tout de même souligner les effets des BMP-2, BMP-6 et BMP-9 qui sont les molécules dont le pouvoir ostéoinducteur est le plus puissant (Miyazono *et al.*, 2010).

Nous pouvons aussi signaler le rôle spécial de la BMP-2 : En absence de BMP-2, les premières étapes de la cicatrisation osseuse ne peuvent pas avoir lieu. Malgré la présence d'autres facteurs présents lors de la réparation des fractures, aucun ne peut compenser l'absence de la BMP-2 (Edgar *et al.*, 2007).

#### 1.3.4 Voies de régulation



Nous avons déjà vu que les effets des BMPs sont concentration et temps dépendants. Le contrôle de ces paramètres peut se faire de différentes manières : soit de façon directe par le contrôle de la synthèse des BMPs soit, de façon indirecte en modulant les intermédiaires

(Récepteurs, Smads ...) ou en modifiant les taux de BMPs actifs par des inhibiteurs (Nohea *et al.*, 2003).

#### 1.3.4.1 Régulation des taux circulant de BMPs actives

##### 1.3.4.1.1 Régulation de la synthèse des BMPs

##### 1.3.4.1.1.1 Autorégulation

Edgar *et al.* montrent en 2007 que les BMPs sont capables de réguler leur propre taux d'expression (Edgar *et al.*, 2007). Il ont en effet montré que les taux d'expression des BMPs endogènes sont modifiés par une activité stimulatrice ou inhibitrice exogène sur des cellules souches mésenchymateuses (Tableau 2).

De plus, cette étude souligne le rôle de la BMP-2 qui semble capable de modifier sa propre expression ainsi que l'expression d'autres membres de la famille BMPs.

**Tableau 2 : Effets de l'activation ou de l'inhibition de la BMP-2 sur l'expression des BMPs endogènes (Edgar *et al.*, 2007)**

	BMP-8A	BMP-6	BMP-5	BMP-4	GDF-10	BMP-3	BMP-2	BMP-1
Control	100	100	100	100	100	100	100	100
Anti-BMP-2	53	182	88	149	102	54	46	65
Noggin	37	238	24	140	ND	24	11	103
rhBMP-2	170	80	105	61	58	132	160	166

Le tableau 1 montre l'effet de certaines molécules sur les taux circulants des BMPs  
Nous pouvons par exemple remarquer que la présence de rhBMP-2 stimule la synthèse de BMP-2.

#### 1.3.4.1.1.2 Régulation exogène

Des études ont montré que certaines molécules ont un effet sur le taux d'expression des gènes des BMPs, en particulier celui de la BMP-2.

L'étude d'ostéoblastes de souris a permis de mettre en évidence des régions promotrices du gène BMP-2 (Ghosh-Choudhury 2001), capables de recevoir Runx2 (Helvering, 2000).

Comme nous l'avons vu précédemment, la BMP-2 induit la synthèse de Runx2 qui peut, à son tour, promouvoir la transcription du gène BMP-2. Cette boucle de régulation positive a pour conséquence d'augmenter le taux de synthèse de la BMP-2 et de potentialiser ses effets.

Plusieurs agents ostéogéniques ont aussi un effet sur la transcription de ce gène. En effet, les acides rétinoïdes, la protéine kinase C et l'ester de phorbol stimulent l'expression de la BMP-2. De plus, ces molécules peuvent agir en synergie.

#### 1.3.4.1.2 Le rôle de la matrice extracellulaire

Lorsque les BMPs sont sécrétées, elles peuvent interagir avec la protéine de la matrice extracellulaire (MEC). La MEC a ensuite la possibilité de séquestrer les BMPs ce qui a pour effet d'en réduire les effets.

Mais elle peut aussi potentialiser leur action en les fixant et les présentant aux cellules cibles (Rosen, 2006).



La matrice extracellulaire interagit avec de nombreuses molécules dont certaines ont un rôle dans la régulation de la densité osseuse.

La MEC est capable de stocker la BMP-3 produite dans les ostéoblastes. Cette BMP se fixe à BMPR-II et bloque le signal des BMPs. C'est une molécule essentielle dans le contrôle de la masse osseuse (Daluiski *et al.*, 2001).

Il est aujourd'hui prouvé que l'inhibine est capable de bloquer l'action des BMPs. Mais son action n'a lieu qu'en présence d'une protéine de la MEC, la bétaglycane (Wiater et Vale, 2003).

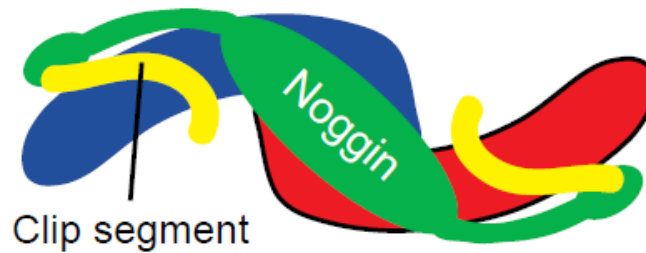
#### 1.3.4.1.3 Les inhibiteurs directs des BMPs

Les antagonistes extracellulaires des BMPs sont assez nombreux. On compte parmi eux les protéines noggin, chordin et follistatin. Ces molécules se lient avec les BMPs avec une grande affinité et perturbent la fixation des ligands sur leurs récepteurs.

Noggin est une protéine de 205 acides aminés qui est sécrétée sous forme d'homodimère. C'est un antagoniste spécifique qui se fixe à la BMP-2 et la BMP-4 avec une grande affinité et à la BMP-7 avec une plus faible affinité (Miyazono *et al.*, 2010).

Une fois noggin fixée, le dimère de BMPs a une affinité beaucoup plus faible pour ses récepteurs (Figure 9).

**Figure 9 : Schéma de fixation de noggin sur un dimère de BMPs (Lin *et al.*, 2006)**



Noggin est représenté en vert et se fixe au dimère BMPs (dont chaque monomère est respectivement représenté en rouge et en bleu) en occupant les sites de fixations aux récepteurs.

De la même façon que noggin, chordin est un inhibiteur que l'on retrouve dans beaucoup de tissus chez l'embryon de souris. Elle a un rôle important durant l'organogenèse. Elle est par ailleurs exprimée à ses taux les plus élevés dans les éléments de différenciation cartilagineuse. Son expression est proche de celles des BMP-2, 4 et 7.

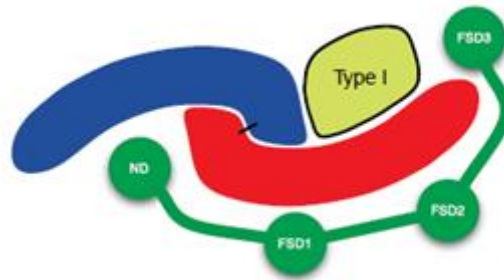
La follistatine a une affinité moins forte que noggin pour les BMPs mais elle a la particularité de pouvoir se fixer à un dimère de BMPs déjà fixé à un récepteur, au niveau du site de fixation d'un autre récepteur. Ainsi, la BMP ne peut plus fixer un deuxième récepteur et donc, la transduction du signal est interrompue.

C'est la différence majeure entre la protéine noggin et la follistatine.

La première est un antagoniste spécifique de la molécule avec laquelle elle se lie mais la follistatine, laissant la possibilité à un autre récepteur de se fixer sur un complexe inhibé (Figure 10), agit de manière plus large sur le nombre de récepteurs disponibles (Miyazono *et al.*, 2010).

La follistatine est en revanche un inhibiteur beaucoup plus puissant pour les activines et son affinité aux BMPs est moins importante.

**Figure 10 : Schéma de fixation de la follistatine sur un dimère de BMPs (Lin *et al.*, 2006)**



La follistatine représentée en vert se fixe à un dimère de BMPs (en rouge et bleu) déjà fixé à un récepteur de type I. Le complexe est néanmoins inactivé car le site de fixation d'un récepteur de type II est occupé par la follistatine.

#### 1.3.4.2 Régulation au niveau des récepteurs

La régulation des récepteurs BMPs de type I et de type II a lieu par des protéines de modification qui induisent par exemple des déphosphorylations, ubiquinations ou autre suppression, d'ectodomaine (Miyazono *et al.*, 2010). Mais la régulation du signal BMP peut avoir lieu par d'autres mécanismes.

##### 1.3.4.2.1 Régulation des récepteurs

Les pseudorécepteurs sont des récepteurs compétitifs qui peuvent fixer les BMPs sans induire les mêmes effets que les récepteurs originels.

Par exemple, BAMBI (BMP and Activin receptor Membran Bound Inhibitor) est un pseudorécepteur de la famille des récepteurs sérine thréonine kinase.

Sa conformation est très proche de celle des récepteurs de type I mais il ne possède pas le domaine intracellulaire qui permet la transduction du signal BMP (Miyazono *et al.*, 2010).

BAMBI peut interagir avec d'autres récepteurs de la famille des TGFβs, et ainsi former des complexes de récepteurs inactifs. L'expression de BAMBI est induite par les BMPs.

Par exemple, durant le développement embryonnaire, les cinétiques d'expression de BMP-4 et BAMBI sont très ressemblantes.

D'autres protéines transmembranaires et cytoplasmiques interagissent avec les récepteurs BMPs et régulent leurs fonctions.

TrkC est un récepteur neuronal capable de se lier à BMPR-II et de modifier les interactions entre BMPR-II et BMPR-I, rendant impossible la phosphorylation du récepteur de type I et empêchant ainsi la transduction du signal.

#### *1.3.4.2.2 Inhibiteurs des récepteurs*

Les inhibiteurs des récepteurs sont des molécules qui se fixent sur les récepteurs et modifient les liaisons entre eux et leurs ligands BMPs.

Par exemple, la dorsomorphine est une petite molécule qui empêche le fonctionnement des récepteurs de type I et de type II. De plus, cette molécule inhibe la phosphorylation des Smad-1, 5 et 8 par les BMPs.

### 1.3.4.3 Régulation des voies de signalisation

#### 1.3.4.3.1 La voie des Smads

Les Smads inhibitrices jouent aussi un rôle essentiel dans la régulation du signal des BMPs. En effet, la fonction des Smad-6 et 7 est d'antagoniser les effets des R-Smads et Co-Smads. Les I-Smads se lient avec les récepteurs de type I, phosphorylés par ceux de type II, *via* leur domaine MH2. En revanche, contrairement aux autres membres de la famille Smad, elles ne se séparent pas de leurs récepteurs et empêchent ainsi la fixation d'une autre molécule sur le complexe.

Smad-7 est capable d'inhiber les récepteurs spécifiques des BMPs mais aussi les non spécifiques contrairement à Smad-6 qui ne peut pas se fixer sur les récepteurs des activines.

De plus, Smad-6 peut former des complexes oligomériques avec Smad-1 et en bloque ainsi la fonction.

Un autre mécanisme d'action est la liaison entre des I-Smad et des facteurs de transcription, dans le noyau.

Smad-7 peut en effet se lier, par son domaine MH2, à des protéines qui se lient aux complexes R-Smads/Co-Smads et perturber la formation de liaisons entre ces complexes et l'ADN (Figure 11).

L'expression des I-Smads est très fortement induite par les BMPs en particulier pendant la différenciation des ostéoblastes.

La transcription des Smads-6 et 7 est sous influence directe des R-Smads. Ainsi les Smads jouent un rôle de régulation du signal des BMPs.

Une régulation de l'activité des protéines Smads peut se faire aussi par une voie de dégradation. En effet, certaines molécules comme les Smurf-1 et 2 peuvent s'associer avec certains membres de la famille Smad (Figure 11).

Ces Smurfs vont provoquer la phosphorylation de R-Smads (déjà activés par une première phosphorylation) et entraînent alors leur dégradation par des complexes enzymatiques circulant dans le cytosol.

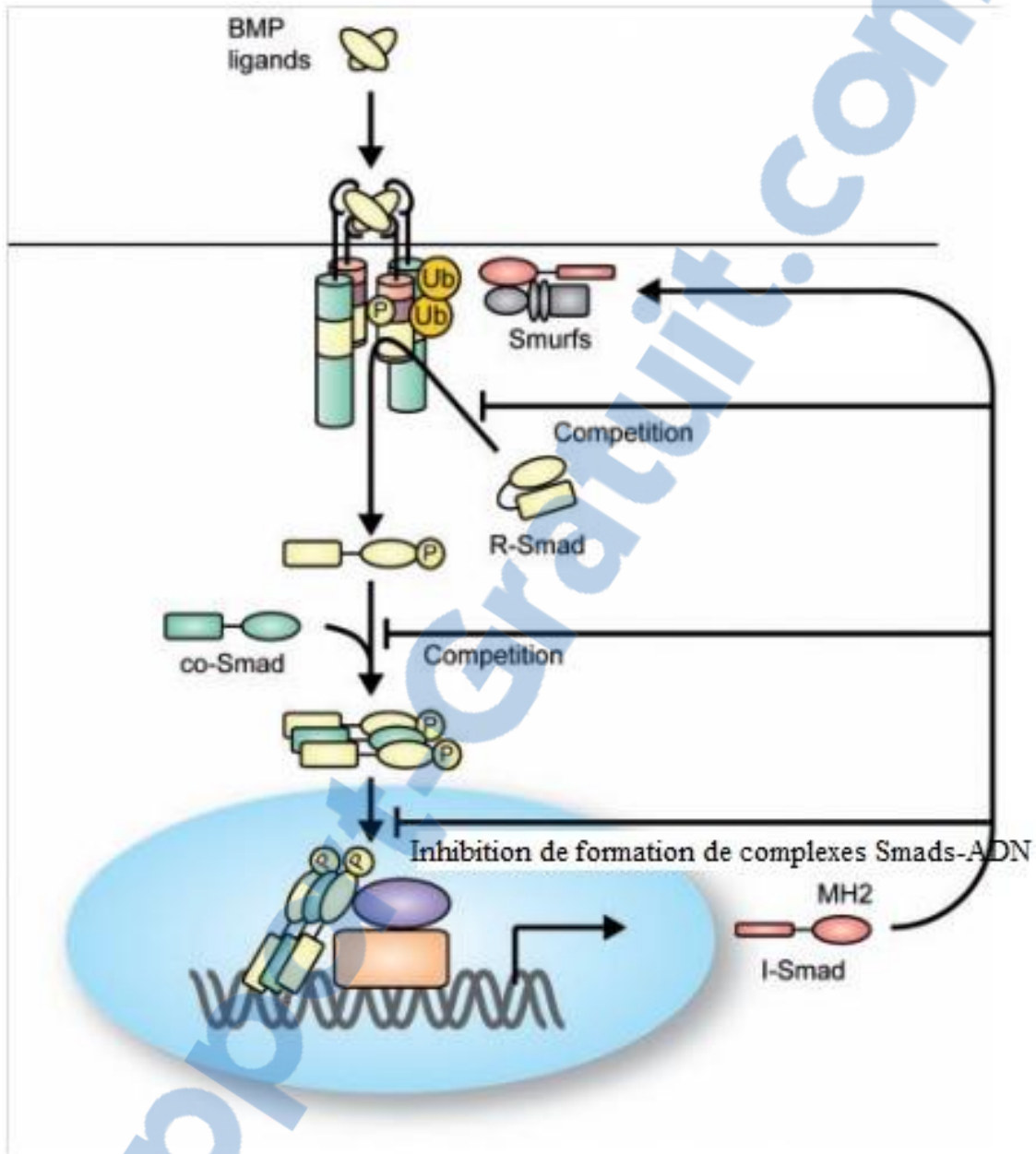
Les Smurfs interagissent aussi avec les I-Smads qui facilitent leur liaison avec des récepteurs de type I leur dégradation.

Enfin, les Smurfs induisent la dégradation des récepteurs BMPs (Miyazono *et al.*, 2010).

D'autres mécanismes font intervenir des phosphatases qui, en déphosphorylant les R-Smads circulant, les inactivent.

De manière générale, toute molécule capable d'interférer avec ces Smads devient un régulateur du signal des BMPs.

**Figure 11 : Mode d'action des I-Smads au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme et du noyau (Miyazono *et al.*, 2010)**



Les I-Smads sont des inhibiteurs compétitifs des R-Smads au niveau des récepteurs de type I et des Co-Smads, formant ainsi des complexes inactifs. Les I-Smads agissent aussi dans le noyau en déstabilisant les liaisons entre les complexes R-/Co-Smads et l'ADN. Les Smads inhibitrices peuvent aussi recruter les Smurf-1 ou 2 ce qui a pour effet la dégradation des récepteurs BMPs ainsi que des R-Smads.

#### 1.3.4.3.2 La voie de la protéine p38

Les I-Smads inhibent très fortement l'activation de la protéine p38.

Smad-6 est capable de se fixer à TAK1 ce qui a pour effet de bloquer la voie TAK1/TAB1 (Yanagisawa *et al.*, 2001).

Nous avons maintenant fini de nous pencher sur l'étude théorique des BMPs. Nous avons pu cerner le mode de fonctionnement de ces molécules et nous en avons révélé les principaux effets.

Nous allons à présent dresser un bilan de leur utilisation en médecine vétérinaire orthopédique.



## 2. DEUXIÈME PARTIE : LES BMPs EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE ORTHOPÉDIQUE

### 2.1 Nature des produits utilisables

Il existe aujourd'hui deux façons majeures de produire des BMPs. La première consiste à les extraire d'un tissu animal qui en contient et la deuxième repose sur les techniques de génie génétique.

#### 2.1.1 Extraction des BMPs naturelles

Il est possible d'extraire les BMPs d'os de bovins (Wang *et al.*, 1988), de lapin (Urist *et al.*, 1979) ou d'humains (Urist *et al.*, 1983).

L'extraction se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, l'os est placé dans un milieu acide ce qui a pour effet de rompre les chaînes polypeptidiques que nous voulons isoler.

Puis, une étape de purification nous permet de ne garder que les BMPs.

Cette technique est pourtant aujourd'hui très peu utilisée pour de nombreuses raisons.

D'une part, le rendement de cette technique est assez faible, de l'ordre de 1 à 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'os cortical (Bessa *et al.*, 2008). Il faudrait donc une quantité très importante d'os pour extraire une dose efficace de la protéine en question.

D'autre part, cette technique présente un risque de transmission de maladie de l'individu donneur à celui qui reçoit le traitement.

Le besoin de posséder ces facteurs de croissance en grandes quantités a poussé les scientifiques à chercher une autre technique pour en obtenir. Le génie génétique nous permet aujourd'hui de fabriquer des quantités importantes de BMPs purifiées.

### 2.1.2 Production de recombinant

Ces recombinants prennent le nom de la molécule qu'ils copient. Par exemple la BMP-2 prendra pour nom rhBMP-2 pour *recombinant human* BMP-2 si elle est d'origine humaine ou rbBMP-2 si elle provient d'os bovin (*recombinant bovine* BMP-2)

#### 2.1.2.1 La technique

De nos jours, les recombinants BMPs sont produits principalement par deux systèmes : dans les cellules de mammifères ou dans des bactéries.

La technique a lieu en un certain nombre d'étapes.

Dans un premier temps, la protéine est extraite de la matrice osseuse déminéralisée (humaine, bovine ou autre). Suit alors une phase de purification et de séquençage. La séquence d'ADN de la protéine est ensuite introduite dans l'ADN du système de production (la cellule de mammifère ou la bactérie).

Puis, ce système est mis en culture pour permettre par la suite la production de la protéine dans un bioréacteur.

Ensuite une purification et une filtration permet d'obtenir la protéine, qui subit enfin une lyophilisation afin d'être conservée.

Le produit obtenu est actif, pur, concentré, stable, stérile, facile d'emploi et peut être conservé un an à température ambiante. Il est de plus disponible en grande quantité.

Les BMPs obtenues à partir de cellules de mammifères sont déjà actives mais en général en faibles rendements.

En revanche, lorsque ces protéines sont produites par des bactéries, elles sont obtenues avec des rendements plus grands mais souvent dans des corps d'inclusion non solubles et inactifs. Un traitement postérieur permet ensuite la libération des protéines actives.

### 2.1.2.2 Les produits obtenus

#### 2.1.2.2.1 Caractéristiques générales de ces produits

Un inconvénient commun de ces deux techniques est que la BMP produite n'est pas glycosylée, contrairement à son homologue naturelle ce qui a pour effet de diminuer sa stabilité ainsi que son activité biologique.

La rhBMP-2 est pour la première fois obtenue par Wang en 1990 dans des cellules ovariennes de hamster chinois. La protéine est alors produite sous trois formes : un pro-peptide de 40-45 kDa, un homodimère mature de 30 kDa et une petite portion de précurseur non clivé de 60 kDa (Wang *et al.*, 1990).

Koenig note que la rhBMP-2 a une forte tendance à adhérer de manière non spécifique aux milieux de cultures et aux matrices extracellulaires chargées négativement (Koenig *et al.*, 1994).

A partir de la fin des années 1990, de nombreuses combinaisons de rhBMPs sont co-exprimées dans les cellules de hamster afin de tester la possibilité de former des hétérodimères et d'en quantifier l'efficacité.

Ces expériences sont concluantes car on observe alors que l'efficacité biologique des hétérodimères de rhBMPs est plus importante que celle de n'importe quel monomère recombinant.

En 1998, Kubler produit de la rhBMP-2 et 4 dans des *Escherichia coli* qui induisent la formation d'os chez des rats en quatre semaines.

En 2003, Yang produit de la BMP-6 dans la même bactérie. Cette protéine est obtenue dans des corps d'inclusion et, après purification, présente *in vitro* des propriétés ostéogéniques (Yang *et al.*, 2003).

De nombreux systèmes de production des BMPs sont listés dans le tableau 3.

Ces dernières années, Vallejo et son équipe ont montré que certains paramètres influent sur la purification des BMPs recombinants. En effet, durant la purification, une étape de repliement de la molécule est cruciale (Vallejo *et al.*, 2002).

L'équipe de scientifiques a montré que ce repliement est sensible au pH, à la température et à la concentration des protéines. En revanche, elle n'est pas particulièrement influencée par les forces ioniques ou les conditions d'oxydo-réduction. La rhBMP-2 est alors purifiée dans un milieu à pH 8,5 à un taux de 750 mg par litre de bactérie.

Depuis, les chercheurs tentent d'affiner les conditions de fabrication et de purification en utilisant majoritairement comme modèles, les cellules ovariennes de hamster et *E. coli* et en jouant sur le pH, la température ainsi que d'autres facteurs.

**Tableau 3 : Diverses modèles d'expression des BMPs recombiants (Bessa *et al.*, 2008)**

BMP	Système d'expression	Nouveauté	References
BMP2	CHO cells	Formation d'os	Wang <i>et al.</i> , 1990b; Israel <i>et al.</i> , 1992
BMP2	Insect cells	Système d'expression alternatif	Maruoka <i>et al.</i> , 1995
BMP2	<i>E. coli</i>	Réduction de l'activité <i>in vitro</i> du site de fixation de l'héparine.	Ruppert <i>et al.</i> , 1996
BMP2	<i>E. coli</i>	Forte expression dans les bactéries.	Li <i>et al.</i> , 1998
BMP2	<i>E. coli</i> , pCYTEXP3	Meilleur repli protéique de BMP-2	Vallejo <i>et al.</i> , 2002; Vallejo and Rinas, 2004
BMP2	<i>E. coli</i>	Sites de fixation à l'héparine	Wurzler <i>et al.</i> , 2004.
BMP2	<i>E. coli</i> , pET-11a	Comparaison avec le propeptide BMP-2	Hillger <i>et al.</i> , 2005
BMP2	<i>E. coli</i> , pET-21a	Utilisation de différents milieux de repli protéique	Long <i>et al.</i> , 2006
BMP2	<i>E. coli</i> , pET-25b	Bioactivité dans les cellules souches	Bessa <i>et al.</i> , 2008
BMP4	<i>E. coli</i>	Formation d'os chez la souris	Kubler <i>et al.</i> , 1998a
BMP4	<i>E. coli</i> , pET-11a	Stabilité dans des milieux physiologiques	Klosch <i>et al.</i> , 2005
BMP6	<i>E. coli</i> , pET-15b	Induction de plusieurs marqueurs ostéogéniques	Yang <i>et al.</i> , 2003
BMP7	CHO cells	Bioactivité chez le rat	Sampath <i>et al.</i> , 1992
BMP2/7, 4/7	CHO cells	Expression des hétérodimères	Israel <i>et al.</i> , 1996

On peut imaginer que, dans quelques années, il sera possible de mettre au point de nouvelles stratégies où seront utilisées des combinaisons de BMPs et d'autres facteurs de croissance pour des effets biologiques encore plus puissants.

Nous pouvons aussi préciser qu'aujourd'hui, les rhBMPs utilisées en clinique sont encore majoritairement produites dans des cellules de mammifères ce qui a pour conséquence un coût élevé du traitement. Nous espérons néanmoins que dans quelques années, l'utilisation de rhBMPs produites dans des bactéries, dont le procédé est moins onéreux, la remplace progressivement.

Aussi, le génie génétique nous permet d'apporter quelques modifications aux molécules synthétisées afin de jouer sur leur bioactivité, leur stabilité ou leur affinité aux cellules, à la matrice extracellulaire ou aux supports auxquels elles sont associées.

#### 2.1.2.2.2 Quelques modifications

L'addition de domaines de fixation d'héparine induit une modification de la bioactivité ainsi que de la biodisponibilité de la rhBMP. Cela a pour conséquence de diminuer son activité *in vitro*, mais augmente sa capacité à induire une formation d'os *in vivo* (Depprich *et al.*, 2005).

Ces modifications, plus détaillées dans le tableau 4 sont un angle d'étude pour la formation de protéines combinées (BMPs associées à d'autres facteurs) qui auront des effets biologiques très puissant mais on peut aussi jouer sur les interactions BMPs/support qui sont, comme nous le verrons par la suite, déterminantes quant à l'action de ces BMPs *in vivo*.

En résumé, ces modifications permettent d'ouvrir un champ de recherche sur la bioactivité des rhBMPs, leur capacité à se lier ou non aux supports auxquels ils sont associés et à la possibilité de fabriquer des hétérodimères dont l'activité biologique est très puissante.

**Tableau 4 : Quelques modifications chimiques ou génétiques et leurs conséquences sur des BMPs (Bessa *et al.*, 2008)**

Modification process	Avantages	References
Clivage enzymatique du site de fixation de l'héparine	Réduction des interactions non spécifiques avec la MEC ce qui augmente la bioactivité des BMPs <i>in vitro</i>	Koenig <i>et al.</i> , 1994; Uludag <i>et al.</i> , 2001
Clivage des BMPs par des plasmines	Réduction des interactions non spécifiques avec la MEC ce qui augmente la bioactivité des BMPs <i>in vitro</i>	Israel <i>et al.</i> , 1992; Hollinger <i>et al.</i> , 1998
Ajout de sites de liaison de l'héparine	Augmente les liaisons à la MEC ce qui augmente la bioactivité des BMPs <i>in vivo</i>	Wurzler <i>et al.</i> , 2004; Depprich <i>et al.</i> , 2005
Immobilisation de peptides synthétiques de séquences BMP partielles	Augmente la stabilité et l'activité des BMPs et réduit le pic de relargage initial	Suzuki <i>et al.</i> , 2000; Saito <i>et al.</i> , 2003, 2004, 2005; Saito <i>et al.</i> , 2006; Seol <i>et al.</i> , 2006; Bergeron <i>et al.</i> , 2007; Park <i>et al.</i> , 2007
Ajout de domaine de fixation à un biomatériau spécifique sur les BMPs	Augmente la rétention des BMPs dans le support	Han <i>et al.</i> , 2002; Schmoekel <i>et al.</i> , 2005
Ajout de domaines pour une fonction biologique spécifique sur les BMPs	Améliore les liaisons cellulaires, la régénération tissulaire	Not yet reported
Modifications chimiques des BMPs	Améliore l'affinité entre les BMPs et le matériau afin d'avoir le profil de relargage désiré	Hollinger <i>et al.</i> , 1998; Uludag <i>et al.</i> , 1999a; Uludag <i>et al.</i> , 1999b; Uludag <i>et al.</i> , 2000; Uludag <i>et al.</i> , 2001
Formation de multiples hétérodimères	L'activité puissante des hétérodimères permet d'utiliser des doses plus faibles	Zhu <i>et al.</i> , 2006 Aono <i>et al.</i> , 1995; Israel <i>et al.</i> , 1996

Nous allons maintenant nous pencher sur l'étendue des possibilités qu'offrent ces molécules en médecine vétérinaire.

## **2.2 Leur utilisation en médecine orthopédique vétérinaire**

Une fois les protéines prêtes à être utilisées, le but consiste à les déposer sur un site choisi (par exemple, le site de fracture). Comme nous l'avons vu précédemment, les BMPs expriment leurs effets lorsqu'ils sont présents un certain temps et à une certaine quantité. L'utilisation de supports, sur lesquels les BMPs sont fixés, est une méthode qui permet la maîtrise spatio-temporelle de la quantité de BMPs.

## 2.2.1 L'utilisation de supports

Dans la plupart des études qui mettent en œuvre l'administration de BMPs exogènes, une matrice est utilisée au niveau du site d'implantation. Bien que cette matrice ne contienne aucun autre élément nécessaire à l'ostéoinduction, c'est un composé essentiel au processus de croissance et à la cinétique de diffusion de la BMP. Le collagène ou d'autres matrices ont été utilisés à titre de support délivrant le ou les facteurs de croissance, et leurs propriétés physico-chimiques, couplées au microenvironnement qu'ils créent, jouent un rôle dans le processus d'induction. En revanche, les propriétés pharmacocinétiques des facteurs de croissance ne sont pas affectées par le support (Sykaras et Opperman, 2003).

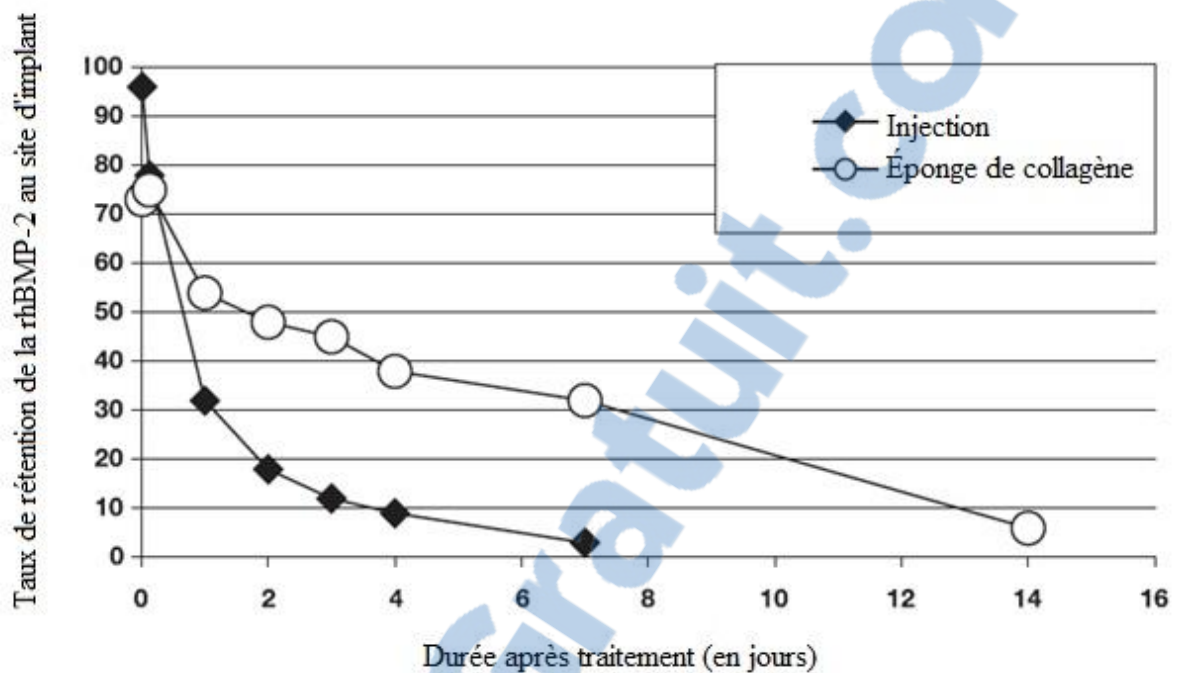
### 2.2.1.1 Leurs rôles

Les supports ont deux rôles majeurs : apporter le facteur au niveau du site d'implantation et le libérer au sein du site afin d'y augmenter sa concentration. Mais ils servent aussi de trame de fixation aux cellules qui affluent vers ce site (Bessa *et al.*, 2008).

L'un des rôles principaux du système d'apport en rhBMP est de retenir le facteur au niveau du site sur une période assez longue. Par exemple, lorsque de la rhBMP-2 est associée à une éponge résorbable de collagène et est implantée dans un ulna de lapin, la protéine est présente sur le site d'implant plus longtemps que lors d'apport brut (Figure 12).



**Figure 12 : Comparaison de la cinétique de rétention de rhBMP-2 lorsqu'elle est introduite dans une éponge de collagène ou sans support (Geiger *et al.*, 2003)**



La Figure 12 montre bien que l'utilisation de matrice en collagène prolonge le temps de présence de la protéine au site d'implantation.

Dans une autre étude, lors de l'injection directe de BMP-2, l'élimination totale du produit dans l'organisme a lieu en trois jours seulement. En revanche, un support hydrogel peut conserver cette même BMP pendant plus de 30 jours.

Aussi, le support doit protéger les BMPs de la dégradation et maintenir leur bioactivité pendant que ces protéines sont libérées sur le site pour permettre la formation d'os de cicatrisation. La libération des BMPs doit être contrôlée dans le temps et l'espace (Bessa *et al.*, 2008).

Ainsi une étude montre que l'ajout de 0.15  $\mu\text{g}$  de rhBMP2 avec matrice est suffisant pour induire la formation d'os sous cutané chez des rats, alors qu'il faut au minimum 0.75  $\mu\text{g}$  de rhBMP-2 (sans matrice associée) pour obtenir des résultats similaires.

### 2.2.1.2 Leurs caractéristiques générales

Certaines caractéristiques sont nécessaires à ces matrices comme la résistance aux forces de compression et de tension, (Geiger *et al.*, 2003).

Les supports doivent être à l'origine d'une réponse inflammatoire du site mais à un niveau optimal, doivent être biodégradables pour permettre la formation d'une interface avec le tissu environnant, parfois totalement dégradable pour laisser envahir la zone par le tissu de cicatrisation (Bessa *et al.*, 2008).

Ils doivent, de plus, présenter une porosité adéquate pour permettre l'infiltration de cellules et la formation de vaisseaux sanguins pour l'irrigation de l'os néoformé.

Ils doivent être biocompatibles, stérilisables, adhérant aux tissus osseux adjacents, posséder une affinité pour les BMPs et être capable de retenir ces protéines un temps suffisant pour influencer sur la réparation du site.

Ils doivent aussi être faciles à manier et stables de manière à pouvoir être commercialisés.

Les caractéristiques du support sont plus ou moins différentes selon la nature de ce dernier. Il faut donc choisir une matrice en fonction de l'environnement dans lequel elle est introduite.

En effet, dans le cas d'une fracture osseuse, le milieu est immobilisé et le support doit permettre l'invasion d'une vascularisation abondante ainsi que la croissance de ces vaisseaux.

En revanche, dans le cas de cicatrisation de cartilage, les forces en jeu sont des forces de compression et de cisaillement. Le support doit donc être capable de supporter ces forces.

### 2.2.1.3 Les interactions support/BMPs

La délivrance de la BMP doit durer un certain temps afin d'induire la formation d'une quantité d'os suffisante pour obtenir un cal de fracture.

Cette libération de la molécule est affectée par de nombreux paramètres dont les liaisons entre BMPs et leurs supports, le pH, la température, la porosité ou encore la concentration en sel. La libération diffère aussi si la BMP est absorbée par la surface du support ou si elle est incorporée au support durant sa fabrication.

L'association de la BMP à son support peut être effectuée par différentes méthodes : par adsorption, par piégeage ou par des liaisons covalentes (Luginbuehl *et al.*, 2004).

Dans le cas de l'adsorption, l'association de la BMP à son support est simple mais peut entraîner certaines modifications de la conformation de la protéine et le relargage peut être moins durable. De plus, un pic initial de délivrance est souvent présent lors de la pose de ce type d'implant.

La méthode de piégeage est souvent utilisée avec des matrices de polymères hydrophobes, décrites comme capables d'immobiliser et de relâcher des agents bioactifs sur de longues périodes.

Cependant, certaines difficultés apparaissent avec ce genre de support car durant leur fabrication, les conditions de pH et de température induisent souvent la dénaturation des BMPs.

De nombreuses recherches visent aujourd'hui à produire ces matrices dans des conditions n'affectant pas la bioactivité de ces protéines.

Enfin, les BMPs peuvent être fixées au support par des liaisons covalentes. Cela peut passer par la formation d'une protéine BMP de fusion qui possède un domaine spécifique de fixation au biomatériau. La synthèse de BMPs recombinants permet aujourd'hui de former des molécules capables de se lier à certains polymères naturels.

#### 2.2.1.4 La cinétique de libération

La cinétique des BMPs étant directement liée à leurs effets, nous devons donc choisir le support en fonction des effets désirés (orientation vers la lignée des chondrocytes/ostéocytes ou adipocytes etc...)

Il est essentiel que la libération de la BMP se fasse sur la durée. Nous savons aujourd'hui qu'un pic initial de libération et un maintien d'un taux bas sur une longue période sont bénéfiques pour une bonne guérison de l'os.

Il faut néanmoins maintenir une concentration suffisamment élevée pour que la BMP puisse se fixer au support mais suffisamment basse pour ne pas que les protéines précipitent (Bessa *et al.*, 2008).

La nature de la matrice ainsi que ses paramètres géométriques influencent de façon directe (taille des cellules qu'ils sont capables de fixer) ou indirecte (effet sur d'autres facteurs comme le taux d'oxygénation de la zone) l'environnement tissulaire et orientent le mécanisme de formation de l'os vers la voie endochondrale ou intramembranaire.

Il est aujourd'hui prouvé que des BMPs combinées à des particules poreuses d'hydroxyapatite ou bien à des fibres de collagène mènent à une ossification intramembranaire. A contrario, une membrane en fibre de verre ou une matrice insoluble d'os conduisent à la formation d'un cartilage intermédiaire (Sykaras et Opperman, 2003).

La cinétique de libération de la protéine est alors fonction du site dans lequel elle est déposée, la nature de la BMP, la quantité de BMP présente dans le support. De manière générale, il existe de nombreux profils cinétiques.

Nous pouvons jouer sur ces profils cinétiques par des modifications chimiques effectuées sur le support ou sur la BMP. Cela nous permet d'obtenir un profil optimal, différent selon les situations mais aussi les espèces (Li et Wozney, 2001).

En fonction de la nature du site à cicatrifier, de nombreux systèmes de délivrance peuvent être utilisés. Cela va des nanoparticules à des structures tridimensionnelles très complexes.

## 2.2.1.5 Quelques exemples de supports

### 2.2.1.5.1 Polymères synthétiques biodégradables

L'un des premiers polymères à avoir été testé est l'acide polylactique en 1992 par Miyamoto. Ce composé a été abandonné car il était accompagné de la libération de produits de dégradation acides toxiques. Mais des études qui ont suivi ont permis de découvrir des matériaux plus efficaces (Miyamoto *et al.*, 1992).

L'un des principaux avantages de ces matériaux est qu'ils ne présentent aucun risque de transmission de maladie contrairement à d'autres matériaux comme par exemple le collagène.

Ils peuvent être injectés en percutané après une étape de chauffage qui les liquéfie. Les polymères reprennent leur forme à température du corps où ils se solidifient.

Les propriétés de biodégradabilité de ces matériaux permettent la formation d'os par les BMPs, avant leur disparition de l'organisme (Saito *et al.*, 2001).

Cette méthode d'implant permet aussi d'effectuer une approche peu invasive sur le site de l'abord chirurgical.

Ces supports ont été testés, associés à des BMPs, dans de nombreux modèles comme la fusion vertébrale chez le chien (Saito *et al.*, 2005), les déficit osseux dans les os longs du lapin (Yoneda *et al.*, 2005) et du chien (Murakami *et al.*, 2006) et dans les défaut d'os du crâne chez le rat (Suzuki *et al.*, 2006). Ces études montrent que ces polymères induisent une bonne réparation de l'os et une libération très efficace de la rhBMP-2 qui peut durer jusqu'à quelques semaines après implantation.

Associés à des phosphates de calcium, ces polymères peuvent induire la formation de nouvel os chez la souris, avec des doses moins importantes de rhBMP (Matsushita *et al.*, 2004), ainsi que dans la cicatrisation de fémur chez le lapin (Matsushita *et al.*, 2006).

L'acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA) combine la bonne adsorption de l'acide poly-lactique et la résistance mécanique de l'acide poly-glycolique. Ce matériau a été très étudié en association avec d'autres matériaux comme des éponges de gélatine dans un modèle d'ulnas de lapin et de défauts dentaires chez le chien (Kawamoto *et al.*, 2003). Dans ces études, la PGLA associée à de la rhBMP induit une formation d'os à des niveaux supérieurs à ceux des groupes contrôles (Bessa *et al.*, 2008).

Une étude plus récente montre que l'association de PLGA à de l'héparine augmente le temps de libération de rhBMP-2 et augmente aussi la formation d'os *in vivo* (Jeon *et al.*, 2007).

Cela pointe la capacité de l'héparine à potentialiser les effets de rhBMPs dans de tels supports.

Les polymères synthétiques sont aussi connus sous la forme d'hydrogels. Leur forte teneur en eau les rend intéressants pour le stockage et la libération de protéines.

Ces gels peuvent simuler une matrice extracellulaire et permettent l'invasion complète du site par les cellules environnantes. Ils possèdent aussi des caractéristiques proches des protéoglycanes du cartilage ce que les rend aussi utiles pour la réparation de cartilage.

Néanmoins, il existe des inconvénients à l'utilisation de tels supports. En effet, ces polymères peuvent induire une inflammation locale qui peut être délétère pour la stabilité et l'activité des BMPs incorporées.

Mais il existe de nombreuses alternatives à ces polymères synthétiques.

#### 2.2.1.5.2 Collagène (Bessa *et al.*, 2008)

Le collagène est le composant non minéral majoritaire de l'os et c'est aussi la protéine la plus abondante dans le tissu conjonctif des mammifères. Cette molécule possède une très bonne biocompatibilité, biodégradabilité et est capable de former des liaisons avec les cellules et d'autres macromolécules.

Elle peut être fabriquée sous forme aqueuse et possède de bonnes propriétés pour la guérison de plaies.

Le collagène peut être conditionné sous différentes formes. Néanmoins, dans la plupart des études, le collagène est utilisé sous forme d'éponges.

Les éponges sont polyvalentes, facilement manipulables et humidifiables.

La fabrication des éponges nécessite plusieurs étapes qui peuvent influencer sur ses interactions avec la BMP qu'on incorpore. L'un des facteurs de liaison les plus importants est le pH.

Ces éponges ont été testées dans de nombreux modèles animaux lors de réparation de fractures, de défaut majeurs d'os, de fusion vertébrale ou encore de reconstruction dentaires et crânio-faciale (Geiger *et al.*, 2003).

L'éponge de collagène retient la BMP et ne la relâche que localement, au niveau du site d'implantation.

La matrice de collagène conserve environ 65% des BMPs pendant l'imprégnation initiale et libère ensuite les facteurs en deux étapes. La première a lieu dans les premières heures qui suivent la pose de l'implant et la seconde dépend des caractéristiques géométriques de la matrice et de l'environnement dans lequel elle est placée (Sykaras et Opperman, 2003).

Certaines études montrent que l'utilisation de telles éponges pour approvisionner le milieu en BMPs semble être une alternative plus sûre que la greffe osseuse.

Elles présentent tout de même quelques inconvénients. Le collagène provient de tissus animaux, il y a donc un risque de réaction immunologique lors de la pose de l'implant. De plus, il existe un risque de transmission de maladies.

C'est pourquoi de nos jours, de nombreuses études cherchent à produire du collagène par génie génétique, afin d'obtenir une molécule purifiée et inoffensive (Yang *et al.*, 2004).

### 2.2.1.5.3 Polymères d'origine naturelle

De nombreuses molécules composent cette famille. Le collagène en fait partie mais aussi des polymères d'amidon, les hyaluronates, des alginates, des composés à base de soie, d'agarose et bien d'autres encore (Mano *et al.*, 2007).

Plusieurs de ces molécules sont des produits dérivés de substances présents dans l'os, le cartilage ou la matrice extracellulaire. C'est la raison pour laquelle ces molécules sont particulièrement étudiées dans le domaine de la médecine régénérative.

Les polymères naturels peuvent néanmoins présenter un risque de réaction immunitaire ou de transmission de maladies. Afin d'éviter les risques de transmission de maladies, des matériaux d'origine végétale sont maintenant utilisés.

Des études *in vitro* ont montré que l'alginate est un bon support pour la prolifération des chondrocytes. Ce composé est surtout utilisé pour la régénération du cartilage.

Le chitosane est obtenu par extraction, à partir de l'exosquelette d'arthropodes. Des études montrent son efficacité en tant que support de BMPs pour la formation d'os et de cartilage (Prabaharan et Mano, 2005).

La fibrine est dérivée de caillots sanguins est peut être fabriquée sous forme de liquide collant. Ce genre de gel est utile car il ne diffuse pas ou peu dans les tissus environnant, ce qui augmente la précision du champ d'action.

Une étude sur la fusion vertébrale chez le rat montre que cette glue de fibrine limite spatialement l'action de rhBMP-2 stockée dans des éponges de collagène, ce qui a pour effet de protéger la moelle épinière proche du site, d'une ossification due à la BMP.

Il existe de nombreuses autres molécules qui sont, de par leurs caractéristiques physico-chimiques, plus ou moins indiquées en fonction des situations. Elles sont en général associées à d'autres types de matrices afin de combiner leurs effets, pour une efficacité maximale.



#### 2.2.1.5.4 Céramiques (Bessa et al., 2008)

L'hydroxyapatite est un phosphate de calcium. C'est la composante minérale majoritaire de l'os (à hauteur de 70%).

Il est aujourd'hui prouvé que les céramiques comme l'hydroxyapatite et d'autres types de phosphates de calcium, peuvent participer à la formation, *in vivo*, d'une couche de matière minérale. Celle-ci augmente l'interface entre le matériau implanté et les tissus environnants.

Elle est fabriquée sous forme de poudre, de granules, de disques ou de blocs.

De nombreuses études montrent que cette molécule est capable de fixer une grande quantité de BMP, mais qu'elle est aussi capable de la relâcher dans le site de l'implant et d'aider à la formation de la nouvelle trame osseuse.

Les phosphates de calcium sont aussi présents sous forme de ciments, de céramiques et d'enduits.

#### 2.2.1.5.5 Micro et nanoparticules

Tous les matériaux que nous avons vus jusqu'à présent peuvent être utilisés pour l'élaboration de ce type de support.

De nombreuses études ont déjà montré leur grande efficacité.

Ces supports possèdent des caractéristiques uniques et résolvent certains problèmes posés par les supports que nous avons cités ci-dessus. En effet, ils peuvent résister à des forces mécaniques beaucoup plus importantes et ils augmentent la stabilité et la bioactivité des facteurs de croissances, au site de libération (Kim et Fisher, 2007).

#### 2.2.1.5.6 Nouvelles approches (Sykaras et Opperman, 2003)

Une nouvelle approche consiste à implanter des matrices qui concentrent activement les BMPs endogènes. Ces derniers sont beaucoup plus efficaces que des BMPs obtenus par génie génétique (ou autre méthode). De plus, ces matrices créent un environnement dans lequel l'os peut se former et de surcroît définir la région où doit se poursuivre la cicatrisation osseuse.

Ces supports peuvent agir comme des échafauds sur lesquels se déposent les cellules et par la suite permettront le dépôt de matrice extracellulaire.

Ils peuvent aussi servir à apporter au site d'implantation certaines cellules inductibles. Certains supports ont ainsi été testés, apportant certaines BMPs accompagnées de moelle osseuse. Le site étant alors enrichi en facteurs d'ossification et en cellules nécessaires au processus, la formation d'os est alors bien meilleure.

Tous ces éléments doivent être pris en compte lors de l'utilisation de tels supports. Leur nature va influencer sur la libération de la protéine qu'ils transportent, mais leur forme géométrique et la façon dont la protéine leur est liée sont des éléments très importants.

Nous allons maintenant nous pencher sur l'utilisation de tels supports associés à des BMPs en médecine vétérinaire.

## 2.2.2 **Bilan des antécédents et indications cliniques**

### 2.2.2.1 La fracture des os longs

La première étude sur laquelle nous allons nous pencher est effectuée par Faria et son équipe en 2007 (Faria *et al.*, 2007).

Une ostéotomie tibiale de 1mm est réalisée chez des chiens et on compare la cicatrisation de la fracture en présence ou non de BMP-2 et à deux doses différentes.

La préparation et l'implantation de BMP-2 combinée à de l'ACS (éponge résorbable de collagène) s'est révélée être une technique assez simple qui n'a présenté aucune réaction négative, au moins durant les huit premiers mois de l'étude.

La matrice de collagène est du collagène de type I d'origine bovine.

Comme nous le savons maintenant, la BMP-2 induit la formation d'os en stimulant la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondroblastes et en ostéoblastes. Mais qu'en est-il de la rhBMP-2 ?

De nombreuses études *in vivo* ont montré que la rhBMP-2 accélère la cicatrisation osseuse lors de défauts majeurs de substance. Cook et al ont utilisé des ulnas sur lesquels ils ont retiré un segment d'os de 25 mm et ont observé les effets de rhBMP sur la cicatrisation de l'os (Cook *et al.*, 1994).

Ils ont aussi testé les propriétés mécaniques des fragments nouveaux d'os. Tous les sites qui présentaient un défaut osseux, à qui de la rhBMP a été additionnée, étaient totalement comblés radiographiquement au bout de huit semaines.

Après 12 semaines, les ulnas avaient récupéré des propriétés mécaniques comparables à des ulnas sains.

Enfin, l'étude histologique de ces fragments d'os montrait la présence d'os lamellaire et d'os réticulaire, tous deux en continuité avec l'os sain.

Itoh montre que l'utilisation de rhBMP-2 combinée à une éponge en gélatine donne des résultats concernant la cicatrisation osseuse encore plus encourageants. Tous les segments osseux traités avec de la rhBMP-2 à une dose supérieure à 160µg présentent des signes radiographiques d'union osseuse au bout de 12 semaines, alors que ceux traités uniquement avec des éponges ne guérissent pas (Itoh *et al.*, 1998).

Concernant la matrice implantée, Riedel a mené une étude en 1999, qui a démontré que l'implantation de rhBMP-2/ACS était sans risque pour le patient et chirurgicalement faisable (Riedel et Valentin-Opran 1999).

Faria montre dans une étude que les chiens traités avec de la rhBMP-2 présentent moins de boiterie que ceux du groupe témoins. Ainsi, ils récupèrent une démarche normale plus rapidement, ce qui contribue à une guérison totale plus rapide chez ces chiens.

Les sites traités avec 0,2 mg/mL de rhBMP-2 présentent des scores de guérison supérieurs à ceux du groupe témoin et du groupe traité avec 0,05 mg/mL de la même molécule.

De plus, des tests mécaniques effectués 8 semaines après l'opération, sur les trois groupes, révèlent que les os du groupe traité avec la plus forte dose de rhBMP-2 sont plus solides que ceux des autres groupes.

D'autres tests mécaniques nous montrent que les os traités avec 0,2 mg/mL de rhBMP présentent des propriétés mécaniques quasiment similaires à un os normal, contrairement à ceux des autres groupes qui présentent une cicatrisation incomplète.

Pinel montre en 2012 que les rhBMPs peuvent accélérer la cicatrisation osseuse *in vivo* lors de fractures ouvertes complexes avec non-union des fragments osseux.

Une cicatrisation plus rapide lors de traitements à des rhBMPs est observée sur treize cas (Pinel *et al.*, 2012).

En 2012, Wei effectue une méta analyse de deux études. Ces études comparent les taux de cicatrisation osseuse dans des cas de fracture tibiale, l'un des groupes ayant, en plus d'un traitement chirurgical, une pose d'implant de rhBMP-2 contenu dans une éponge résorbable de collagène.

Nous pouvons alors constater que le taux de deuxième intervention est plus faible chez les patients traités à la rhBMP-2.

De plus, le taux d'échec du traitement est aussi plus faible dans ce dernier groupe.

Enfin, le taux d'infection postopératoire est équivalent tout comme la douleur ressentie après le temps opératoire (Wei *et al.*, 2012).

Enfin, Ohura compare la guérison d'un large défaut de matière osseuse chez des rats. Trois groupes sont constitués. Le premier ne reçoit aucun traitement, les deux autres reçoivent un implant contenant de la rhBMP-2 à des doses différentes (Ohura *et al.*, 1998).

Le groupe ayant reçu la plus grande dose de BMP montre des signes de guérison osseuse à 3 semaines de l'opération. Le déficit d'os est comblé par un large cal osseux nouvellement formé.

Dans le groupe ayant reçu la plus faible dose de rhBMP-2, l'union osseuse n'est obtenue qu'au bout de 6 semaines et le groupe témoin (sans rhBMP-2) n'a pas présenté d'union 9 semaines après l'intervention.

La rhBMP-2 est donc très prometteuse en cas de fracture d'os longs même lors de larges défauts de matière.

Mais le potentiel de ces facteurs de croissance est aussi utilisé dans d'autres indications.

#### 2.2.2.2 L'arthrodèse intervertébrale

Geiger se penche sur les fusions vertébrales utilisées en cas d'anomalies ou suite à des opérations touchant la colonne vertébrale.

Le traitement actuel est une fusion par utilisation de greffe osseuse. Cette méthode comprend malheureusement des inconvénients comme la douleur sur le site de prélèvement lors d'autogreffe accompagnée de troubles de cicatrisation du site de prélèvement (hématome, saignement abondant entre autres). Le rejet est toujours envisageable lors d'allo ou de xéno greffe (Geiger *et al.*, 2003).

De plus, cette technique présente un certain taux de non-union (entre 5 et 35%) mais les BMPs semblent être une alternative intéressante dans ce contexte.

De nombreuses études ont montré l'efficacité de la rhBMP-2 à stimuler la fusion vertébrale, réduisant le temps nécessaire à une fusion complète et augmentant la qualité de la fusion.

Aussi, l'os nouvellement créé en présence de rhBMP-2 est, histologiquement, plus proche de l'os sain que celui induit par une greffe seule (Walker et Wright 2002).

Des fusions ont été ainsi réalisées tout le long de la colonne vertébrale, des vertèbres cervicales aux vertèbres lombaires, avec des supports différents. Tous semblent souligner l'intérêt de l'usage des BMPs.

Une étude sur les effets de la rhBMP-2 a été réalisée sur la fusion vertébrale chez le lapin (Walker et Wright, 2002). Lors de cette expérience, l'ajout de rhBMP-2, en plus d'une greffe, induit dans 100% des cas une fusion complète alors que le groupe n'ayant reçu que la greffe a un taux de succès de 42%.

Vaccaro s'est intéressé aux effets de la rhBMP-7 sur la fusion des vertèbres lombaires.

Dans son étude, nous pouvons constater que l'apport de BMP-7 induit une fusion vertébrale visible radiographiquement dans plus de la moitié des cas.

De plus, dans 91% des cas, de l'os apparaît entre les corps vertébraux du site d'implant (Vaccaro *et al.*, 2003).

### 2.2.2.3 Les réparations dentaires et faciales

Nagao effectue une expérience sur des chiens, où il compare la cicatrisation de l'os alvéolaire en présence de rhBMP-2 ou non (Nagao *et al.*, 2002).

Il apparaît que les groupes traités avec de la rhBMP-2 présentent de l'os nouvellement formé 4 semaines après implantation alors que les groupes non traités ne présentent aucune cicatrisation, même 12 semaines après opération.

De plus, la densité de l'os nouvellement formé en présence de rhBMP-2 est identique à celle de l'os cortical environnant, à 12 semaines.

Marukawa s'est penché sur le comblement de défaut de matière mandibulaire chez le primate (Marukawa *et al.*, 2001 ; Marukawa *et al.*, 2002).

Il nous montre que l'utilisation de rhBMP-2 permet également le comblement de larges défauts de matière dans des mandibules de primates.

L'os nouvellement synthétisé est durable et fonctionnel chez les individus traités.

L'utilisation seule de rhBMP ne permet d'ailleurs pas de cicatrisation chez les vieux singes mais est suffisante chez les jeunes.

La cicatrisation est plus lente chez le primate que chez le chien mais la qualité de l'os nouvellement créé est meilleure chez le singe.

Nous voyons ici qu'en fonction de caractéristiques d'espèce, de race ou individuelles, les effets des BMPs sont différents.

Aucun signe de toxicité ou de formation ectopique d'os n'a été signalé dans toutes les études citées ci-dessus.

#### 2.2.2.4 La dose

Il est important de préciser que la dose utilisée est différente en fonction des expériences.

Elle est dépendante de l'espèce traitée, de l'indication thérapeutique, du site d'implantation mais aussi de facteurs plus individuels comme l'âge de l'animal (Marukawa *et al.*, 2002).

Un trop faible dosage induit des effets de moindre intensité mais un surdosage peut orienter d'autres voies de différenciation et ainsi la BMP peut ne pas avoir les effets escomptés.

C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de s'appuyer sur des études dans lesquels plusieurs dosages sont testés, dans les mêmes indications et chez la même espèce.

C'est dans cette démarche que le premier, et actuellement seul, produit vétérinaire à base de rhBMP a vu le jour en 2012.

## **2.3 Produit vétérinaire disponible : Le Trucient (ND)**

Nous allons maintenant nous intéresser au seul produit contenant de la rhBMP présent actuellement sur le marché vétérinaire : le Trucient (ND).

Sa fabrication est basée sur l'étude de Faria et son équipe que nous avons cité précédemment (Faria *et al.*, 2007).

### **2.3.1 Description du produit**

#### **2.3.1.1 Composition du produit**

Le produit est constitué d'un flacon de rhBMP-2 lyophilisée, un flacon de solvant et deux éponges résorbables de collagène.

Le flacon de lyophilisat contient 0,66 mg de rhBMP-2.

Après reconstitution, la concentration de rhBMP-2 dans le produit est de 0,2 mg/ml.

La rhBMP est fabriquée à partir d'ovaires de hamster. Les éponges de collagène sont de type I et sont d'origine bovine.



### 2.3.1.2 AMM

L'espèce de destination est le chien. L'autorisation de mise sur le marché est obtenue pour le traitement complémentaire de la réduction chirurgicale à foyer ouvert des fractures diaphysaires.

### 2.3.2 **Modalités d'utilisation**

Afin d'être utilisée, la rhBMP-2 doit au préalable être reconstituée sous une forme active puis intégrée dans son support, les éponges de collagène.

Tout d'abord, il faut désinfecter avec de l'alcool les bouchons des flacons de lyophilisat et de solvant (Photo 1).

**Photo 1 : Désinfection des bouchons des flacons (Moissonnier, ENVA, 2013)**



Ensuite, on prélève 3,2 mL de solvant que l'on injecte dans le flacon contenant le lyophilisat.

On obtient alors une solution concentrée à 0,2 mg/mL de rhBMP-2 (Photo 2).

**Photo 2 : Solution de rhBMP-2 reconditionnée (Moissonnier, ENVA, 2013)**



A partir de ce stade, les manipulations doivent se faire dans un milieu le plus stérile possible.

Pour l'imprégnation de la rhBMP dans les éponges, 1,4 mL de la solution doit être versé sur chacune des éponges (Photo 3).

**Photo 3 : Eponge de collagène, juste après imprégnation de la solution de rhBMP-2  
(Moissonnier, ENVA, 2013)**



Il faut maintenant attendre au moins 15 minutes avant d'utiliser les éponges préparées (Photo 4).

**Photo 4 : Eponges de collagène 15 minutes après l'imprégnation par la rhBMP-2  
(Moissonnier, ENVA, 2013)**



On effectue l'implantation des éponges une fois que le site de fracture est réduit. La quantité d'éponge implantée est déterminée par l'anatomie de la fracture et la possibilité de fermer la plaie sans trop tasser ou comprimer le produit.

L'éponge doit recouvrir la zone de fracture.

Enfin, une fois l'éponge mise en place, il ne faut pas irriguer la zone d'implant car la solution de rhBMP-2 serait ainsi éliminée du site d'implantation. Il est important de recouvrir l'implant par les tissus mous environnants avant fermeture des couches superficielles du site de fracture.



# CONCLUSION

Les BMPs sont des facteurs de croissance dont les pouvoirs ostéoinducteur et chondroinducteur sont actuellement considérés comme essentiels.

Les nombreux membres de cette famille, dont les effets diffèrent, jouent, en synergie, un rôle majeur dans des situations diverses.

Leur importance a été mise en évidence depuis la période embryonnaire et se poursuit durant l'ensemble de la vie des individus, dans un contexte physiologique ou pathologique.

Le génie génétique permet aujourd'hui de produire ces protéines et de les utiliser dans un cadre thérapeutique.

La BMP-2 est la molécule de la famille des BMPs dont les effets sont les plus puissants.

Le premier produit à AMM vétérinaire dont le principe actif est la BMP-2 a été commercialisé à la fin de l'année 2012.

Cette protéine est indiquée en médecine vétérinaire pour traiter les fractures des os longs, lors d'arthrodèse intervertébrale et pour les réparations maxillo-faciales.

Les BMPs sont encore peu employées en pratique vétérinaire courante. Notre travail vise à mieux les faire connaître et à favoriser leur utilisation.

Chez l'animal domestique, les études doivent être poursuivies pour mieux caractériser leurs indications, leur intérêt et leurs possibles effets indésirables.





## BIBLIOGRAPHIE

- BESSA PC, CASAL M, REIS RL, (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering : the road from the laboratory to the clinic, part I, *journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **2**, 1–13.
- BROWN MA, ZHAO Q, BAKER KA, NAIK C, CHEN C, PUKAC L, *et al.* (2005). Crystal Structure of BMP-9 and Functional Interactions with Pro-region and Receptors, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, n°26, 25111-25118.
- CHIRON P, (2004). Les protéines inductrices de l'os, Cahiers d'Enseignement de la SOFCOT.
- CHO T, GERSTENFELD LC, EINHORN TA, (2002). Differential temporal expression of members of the TGF superfamily during murine fracture healing, *journal of bone and mineral research*, **17**, n°3, 513-520
- COOK SD, BAFFES GC, WOLFE MW, SAMPATH TK, RUEGER DC, WHITECLOUD TS, (1994). Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model, *Clin Orthop Relat Res* 302–312.
- DALUISKI A, ENGSTRAND T, BAHAMONDE ME, GAMER LW, AGIUS E, STEVENSON SL, *et al.* (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density, *Nat Genet*, **27**, 84-88.
- DEPPRICH R, HANDSCHEL J, SEBALD W, KÜBLER NR, WÜRZLER KK, (2005). Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein mutants, *Mund Kiefer Gesichtschir*, **9**, 363–368.
- EDGAR CM, CHAKRAVARTHY V, BARNES G, KAKAR S, GERSTENFELD LC, EINHORN TA, (2007). Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells, *Bone*, **40**, 1389-1398.
- FARIA M, YAN L, HEANEY K, UTHAMANTHIL RK, MUIR P, MARKEL MD, (2007). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in absorbable collagen sponge enhances bone healing of tibial osteotomies in Dogs, *Veterinary Surgery*, **36**, 122–131.
- GANAN Y, MACIAS D, DUTERQUE-COQUILLAUD M, ROS MA, HURLE JM, (1996). Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod, *Development* **122**, 2349-2357.

- GEIGER M, LI RH, FRIESS W, (2003). Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, 1613 – 1629.
- GHOSH-CHOUDHURY N, GHOSH CHOUDHURY G, HARRIS MA, WOZNEY J, MUNDY GR, ABOUD SL, HARRIS SE, (2001). Autoregulation of mouse BMP-2 gene transcription is directed by the proximal promoter element, *biochemical and biophysical research communications*, **286**, 101–108.
- GLEYZOLLE B (2007). Effet de la BMP-2 sur le cal d'allongement du lapin en phase de consolidation. Thèse Méd. Vet., Lyon.
- GUIMOND JC (2010). Analyse fonctionnelle du gène BMP-2 lors de la régénération du membre chez l'axolotl. Thèse Med, Montréal.
- HELVERING LM, SHARP RL, OU X, GEISER AG (2000). Regulation of the promoters for the human bone morphogenetic protein 2 and 4 genes, *Gene*, **256**, 123–138.
- ITOH T, MOCHIZUKI M, NISHIMURA R, MATSUNAGA S, KADOSAWA T, KOKUBO S, *et al.* (1998). Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs, *J Vet Med Sci*, **60**, 451-458.
- JEON O, SONG SJ, KANG SW, PUTNAM AJ, KIM BS (2007). Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold, *Biomaterials*, **28**, 2763–2771.
- KAWAMOTO T, MOTOHASHI N, KITAMURA A, BABA Y, SUZUKI S, KURODA T, (2003). Experimental tooth movement into bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Cleft Palate Craniofac J*, **40**, 538–543.
- KIM K, FISHER JP, (2007). Nanoparticle technology in bone tissue engineering, *J Drug Target*, **15**, 241–252.
- KOENIG BB, COOK JS, HANCE D, WOLSING J, TING J, TIESMAN P, (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells, *Mol Cell Biol*, **14**, 5961–5974.
- LEBOY PS, (2006). Regulating Bone Growth and Development with Bone Morphogenetic proteins, *New york academy of science*, **1068**, 14-18.
- LI RH, WOZNEY JM, (2001). Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins, *Trends Biotechnol*, **19**, 255–265.
- LIN JS, LERCH TF, COOK RW, JARDETZKY TS, WOODRUF TK, (2006). The structural basis of TGF-b, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding, *Reproduction*, **132**, 179-190.
- LUGINBUEHL V, MEINEL L, MERKLE HP, GANDER B, (2004). Localized delivery of growth factors for bone repair, *Eur J Pharm Biopharm*, **58**, 197–208.

- MACIAS D, GAÑAN Y, SAMPATH TK, PIEDRA ME, ROS MA, HURLE JM, (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development, *The Company of Biologists Limited*, **124**, 1109-1117.
- MANO JF, SILVA GA, AZEVEDO HS, MALAFAYA P.B, SOUSA RA, SILVA SS, *et al.*, (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends, *J R Soc Interface*, **4**, nº17, 999–1030.
- MARUKAWA E, ASAHINA I, ODA M, (2002). Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*, **31**, 287–295.
- MARUKAWA E, ASAHINA, ODA M, SETO I, ALAM I, ENOMOTO S, (2001). Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles, *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **39**, 452–459.
- MATSUSHITA N, TERA I H, OKADA T, NOZAKI K, INOUE H, MIYAMOTO S *et al.*, (2004). A new bone-inducing biodegradable porous beta-tricalcium phosphate, *J Biomed Mater Res A*, **70**, 450–458.
- MATSUSHITA N, TERA I H, OKADA T, NOZAKI K, INOUE H, MIYAMOTO S *et al.*, (2006). Accelerated repair of a bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant, *J Orthop Sci*, **11**, 505–511.
- MIYAMOTO S, TAKAOKA K, OKADA T, YOSHIKAWA H, HASHIMOTO J, SUZUKI S *et al.*, (1992). Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop*, **278**, 274-285.
- MIYAZONO K, KAMIYA Y, MORIKAWA M, (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction, *J. Biochem*, **147**, 35–51
- MURAKAMI N, SAITO N, TAKAHASHI J, OTA H, HORIUCHI H, NAWATA M, *et al.*, (2003). Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier, *Biomaterials*, **24**, 2153–2159.
- NAGAO H, TACHIKAWA N, MIKI T, ODA M, MORI M, TAKAHASHI K, *et al.*, (2002). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in alveolar ridge defects in dogs, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*, **31**, 66–72.
- NOHEA A, SHAH P, KEPPLER L, RUTKOWSKI J, (2003). BMP: An elixir for bone grafting, *Journal of oral implantology*, **38**, 767-778.
- ONISHI T, ISHIDOU Y, NAGAMINE T, YONE K, IMAMURA T, KATO M, *et al.*, (1998). Distinct and overlapping patterns of localization of BMP family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats, *Bone*, **22**, No 6, 605-612.

- OHURA K, HAMANISHI C, TANAKA S, MATSUDA N, (1998). Healing of segmental bone defects in rats induced by a b-TCP-MCPM cement combined with rhBMP-2, *Journal of Biomedical Materials Research*, **44**, Issue 2, 168–175.
- PINEL CB, PLUHAR E, (2012). Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein in cats and dogs, a review of 13 cases, *Canadian Veterinary J*, **53**, 767-774.
- PRABAHARAN M, MANO JF, (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems, *Drug Deliv*, **12**, 41–57.
- RAUCH F, LAUZIER D, CROTEAU S, TRAVERS R, GLORIEUX FH, HAMDY R, (2000). Temporal and spatial expression of BMP-2, -4 and -7 during distraction osteogenesis in rabbits, *Bone*, **27**, n<sup>o</sup>3, 453-459.
- RIEDEL GE, VALENTIN-OPRAN A, (1999). Clinical evaluation of rhBMP-2/ACS in orthopedic trauma: a progress report, *Orthopedics*, **22**, 663–665.
- ROSEN V, (2006). BMP and BMP inhibitors in bone, *annals of the New York academy of science*, **1068**, 19-25.
- SAITO N, OKADA T, HORIUCHI H, HIROSHI H, NARUMICHI M, JUN T, *et al.* (2001). Biodegradable poly-lactic acid–polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone, *J Bone Joint Surg Am*, **83A**, 92–98.
- SAITO N, MURAKAMI M, TAKAHASHI J, HORIUCHI H, OTA H, KATO H, *et al.* (2005). Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins, *Adv Drug Deliv Rev*, **57**, 1037–1048.
- SAREMBA S, NICKEL J, SEHER A, KOTZSCH A, SEBALD W, MUELLER TD, (2007). Type I receptor binding of BMP-6 is dependent on N-glycosylation of the ligand, *FEBS journal*, **275**, 172-183.
- SCHEUFLER C, SEBALD W, HUEISMEYER M, (1999). Crystal Structure of Human Bone Morphogenetic Protein-2, *J. Mol. Biol.*, **287**, 103-115.
- SUZUKI A, TERAH H, TOYODA H, NAMIKAWA T, YOKOTA Y, TSUNODA T, *et al.*, (2006). A biodegradable delivery system for antibiotics and recombinant human bone morphogenetic protein-2: a potential treatment for infected bone defects, *J Orthop Res*, **24**: 327–332.
- SYKARAS N, OPPERMAN LA, (2003). BMPs: How do they function and what can they offer the clinician, *Journal of Oral Science*, **45**, n<sup>o</sup>2, 57-73.
- URIST MR, MIKULSKI A, LIETZE A, (1979). Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 1828–1832.
- URIST MR, SATO K, BROWNELL AG, MALININ TI, LIETZE A, HUO YK, *et al.*, (1983). Human bone morphogenetic protein, *Proc Soc Exp Biol Med*, **173**, 194–199.

- VACCARO AR, PATEL T, FISCHGRUND J, ANDERSON G, TRUUMEEES E, HERKOWITZ H *et al.*, (2003). A pilot safety and efficacy study of OP-1 putty (rhBMP-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions, *Eur Spine J*, **12**, 495-500.
- VALLEJO LF, BROKELMANN M, MARTEN S, TRAPPE S, CABRERA-CRESPO J, HOFFMANN A *et al.*, (2002). Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*, *J Biotechnol*, **94**, 185–194.
- WALKER DH, WRIGHT NM, (2002). Bone morphogenetic proteins and spinal fusion, *Neurosurg Focus* *13*, **6** Article **3**, 1-13.
- WANG EA, ROSEN V, CORDES P, HEWICK RM, KRIZ MJ, LUXENBERG DP, *et al.*, (1988). Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors, *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 9484–9488.
- WANG EA, ROSEN V, D'ALESSANDRO JS, BAUDUY M, CORDES P, HARADA T *et al.*, (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation, *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 2220–2224.
- WEI S, CAI X, HUANG J, XU F, LIU X, WANG Q, (2012). Recombinant human BMP-2 for the treatment of open tibial fractures, **35**, n°6, 847-854.
- WIATER E, VALE W, (2003). Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling, *J Biol Chem*, **278**, 7934-7941.
- WINNIER G, BLESSING M, LABOSKY PA, HOGAN BL, (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse, *Genes and Development*, **9**, 2105-2116.
- YANAGISAWA M, NAKASHIMA K, TAKEDA K, OCHIAI W, TAKIZAWA T, UENO M *et al.*, (2001). Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7, *Genes Cells*, **6**, 1091-1099.
- YANG C, HILLAS PJ, BAEZ JA, NOKELAINEN M, BALAN J, TANG J *et al.*, (2004). The application of recombinant human collagen in tissue engineering, *BioDrugs*, **18**, 103–119.
- YANG JH, ZHAO L, YANG S, WU SQ, ZHANG J, ZHU TH, (2003). Expression of recombinant human BMP-6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay in vitro, *Chinese Journal of biotechnology*, **19**, 556-560.
- YONEDA M, TERAH H, IMAI Y, OKADA T, NOZAKI K, INOUE H *et al.*, (2005). Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant, *Biomaterials*, **26**, 5145–5152.



# **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES BONE MORPHOGENETIC PROTEINS ET LEURS APPLICATIONS A LA CHIRURGIE ORTHOPÉDIQUE VÉTÉRINAIRE**

**SITBON Ange**

**Résumé :**

**Cette thèse propose dans un premier temps un état des lieux des connaissances accumulées sur les bone morphogenetic proteins (BMPs), puis une présentation des produits vétérinaires actuellement disponibles.**

**Ces protéines, impliquées depuis l'embryogenèse jusqu'à la vie post-natale, ont des effets majeurs sur la cicatrisation de l'os dans divers contextes.**

**Il apparait que ces protéines peuvent apporter une aide considérable aux vétérinaires dans un contexte de chirurgie orthopédique et ouvrent des perspectives quant aux traitements chirurgicaux des tissus osseux et cartilagineux.**

**Mots clés:**

**CHIRURGIE ORTHOPÉDIQUE/TRAITEMENT CHIRURGICAL/BONE MORPHOGENETIC PROTEIN/BMP/CICATRISATION/OS/CARNIVORE.**

**Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Pr. MOISSONNIER Pierre

Assesseur : Pr. FONTAINE Jean-Jacques

# **BIBLIOGRAPHICAL STUDY OF THE BONE MORPHOGENETIC PROTEINS AND THEIR APPLICATIONS TO THE VETERINARY ORTHOPEDIC SURGERY**

**SITBON Ange**

## **Summary:**

**This thesis proposes as a first step an inventory of accumulated knowledge on bone morphogenetic proteins (BMPs) and a presentation of veterinary products currently available.**

**These proteins, involved from embryogenesis to post-natal life, have major effects on bone healing in various contexts.**

**It appears that these proteins can provide considerable assistance to veterinarians in the context of orthopedic surgery and open perspectives on the surgical treatment of bone and cartilage.**

## **Keywords:**

**ORTHOPEDIC SURGERY/SURGICAL TREATMENT/BONE MORPHOGENETIC PROTEIN/BMP/HEALING/BONE/CARNIVORE.**

## **Jury :**

Président : Pr.

Director : Pr. MOISSONNIER Pierre

Assessor : Pr. FONTAINE Jean-Jacques