

UNIVERSITE MOHAMMED

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2009

THESE N°: 185/09

Application de la thérapie cellulaire
dans
le traitement des défauts de
consolidation osseuse

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mr Ahmed Bayhass KARKAZAN

Né le 05 Juin 1981 à Fès

Pour l'Obtention du
Doctorat en Médecine

MOTS CLES: Pseudarthrose – Cellules souches mésenchymateuses – Greffe médullaire

Consolidation osseuse – Thérapie cellulaire

JURY

Mr. Mustapha MAHFOUD

PRESIDENT

Professeur de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique

Mr. Omar CHOKAIRI

RAPPORTEUR

Professeur de Biologie et d'Histologie

Mme. Malika ESSAKALLI

Professeur d'Immunologie

Mr. Farid ISMAEL

Professeur Agrégé de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique

Mr. Samir KARRAKCHOU

} **JUGES**

Chirurgien Orthopédiste et Traumatologue

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم:

سنة : 2009

تطبيق العلاج الخليوي في حالات
التمفصل الكاذب للعظام

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرف

السيد : أحمد بيهس قرقران

المزاداد في 05 يونيو 1981 بفاس

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: التمفصل الكاذب للعظام – الخلايا الجذعية -زراع النخاع العظمي

جبر الكسور – العلاج الخليوي.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

السيد: مصطفى محفوظ

رئيس

أستاذ في جراحة العظام والمفاصل

مشرف

السيد: عمر الشقيري

أستاذ في علم الأنسجة

السيدة: مليكة الصقلي

أستاذة في علم الدم والمناعة

السيد: فريد اسماعيل

أستاذ مبرز في جراحة العظام والمفاصل

السيد: سمير كراکشو

جراح في العظام والمفاصل

إهداء

(ربي تقبل مني واجعله في ميزان حسناتي يوم القيامة، إنك أنت السميع المجيب)

إلى شفيعي وحببي رسول الله صلى الله عليه وسلم...

إلى نواره بيتنا و نور أعيننا نالة...

إلى من كانوا لي عوناً وكنت عليهم عبئاً:

■ أبي ومثلي الأعلى..... الأستاذ، العلامة، الدكتور محمد قرقران.

■ الشمعة التي احترقت دوماً لتضيء درب حياتي..... ماما حنان.

■ أخي وسندي..... المهندس الأستاذ الحسن.

■ أختي الحنون.....المهندسة عزة.

■ أختي وحببة قلبي.. الإعلامية أروى.

■ صهري وأخي وصديقي.. رضوان.

■ صهري وأخي وصديقي.. هشام.

... إلى أرواحهم الطاهرة الساكنة في أعلى عليين إنشاءً الله..جديّ جسن ومحمد

قرقران.جدتيّ عزيزة و كلثم وخالي أبو رشيد.

... إلى من أعطى ولازال يعطي.. خالي هيثم.

...إلى القلب الحنون و العطوف..إلى عمي أبو وائل.

...إلى مسقط رأس أبي وأمي عين الفيحة الحضارات - سوريا..

...إلى مسقط رأسي وإخوتي فاس الأصالة المغرب...

Remerciements,

A notre directeur de cette thèse ;

Monsieur le Docteur CHOKAIRI Omar
Docteur en Médecine
Chef du département de biologie et de cytologie à la
faculté de médecine et de pharmacie de rabat.

Pour avoir été l'initiateur et le chef d'orchestre
de ce travail ;
Pour toute l'expérience et l'aide apportées ;
Votre soutien, votre disponibilité et votre
compréhension constante ;
Que toutes vos qualités soient honorées par ce
travail.

A notre président de jury

Monsieur le Professeur MAHFOUD
Mustapha.

Professeur de Chirurgie Orthopédique et
Traumatologique

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de présider
notre jury ;

Nous tenons à vous remercier pour votre accueil et
vos encouragements ;

Trouvez ici l'expression de notre reconnaissance et
notre profond respect.

A notre membre du jury :

Madame le Professeur

ESSAKALLI Malika

Professeur d'hématologie et d'immunologie.
Chef de service de transfusion sanguine a l'hôpital
Avicenne.

Nous vous remercions pour la confiance que vous nous
avez témoignée en acceptant de juger ce travail.

Soyez assuré de notre sincère reconnaissance.

A notre membre du jury :

Monsieur le Professeur
ISMAEL Farid,

Professeur agrégé de Chirurgie Orthopédique et
Traumatologique

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,
Nous vous remercions pour la qualité de votre
enseignement et pour nous avoir fait partager vos
précieuses connaissances dans beaucoup de domaines.
Que ce travail témoigne de notre profond respect et de
notre dévouement.

Soyez assuré de notre sincère reconnaissance.

A ;

Monsieur le docteur KARRAKCHOU Samir

Orthopédiste et Traumatologue à l'hôpital provincial de skhirat-temara.
Président de la société marocaine de chirurgie orthopédique et
traumatologique.

Président de la société marocaine des orthopédistes du secteur publique.

Président de la PANARABE.

Trésorier -adjoint de la société marocaine de l'arthroscopie.

Pour nous avoir fait découvrir la Chirurgie Orthopédique
et Traumatologique.

Nous avons admiré vos valeurs morales.

Nous avons été impressionnés par vos connaissances
techniques et chirurgicales. Nous sommes fiers d'être
votre élève.

Nous serions heureux de poursuivre cette collaboration
dans le futur.

Soyez assuré de notre sincère reconnaissance et gratitude.

A mes amis :

- ABBAD loubna pour ta gentillesse Mlle la présidente du CEM.
- ABOUZAHIR sanae pour ta spontanéité Mlle la vice présidente du CEM.
- Amina pour votre bonne humeur inébranlable ...
- Asmae en souvenir de l'accident en jet-ski à dakhla sur l'île du crocodile kheliha binatna..lol
- El OTMANI wafae pour m'avoir tant aidé sans t'énerver ; Soyez assurée de notre profonde reconnaissance et notre sincère gratitude.
- Kasmi dalal pour tous les beaux moments que nous avons passés ensemble.
- Nadia l'infirmière du bloc pour tes qualités humaines et techniques
- Zouiri ghizlane pour ton esprit ouvert, ta gentillesse et ta disponibilité.
- BENYAHYA mohammad pour ta tres belle ville CHAWEN et surtout pour le thé vert bene3na3 l3ebdi que tu nous a toujours préparés..
- A BOUCHAOUA Soufiane pour notre amitié..
- DERDABI omar pour l'amour de ton club le real madrid.
- FACHKOUL Moncef pour ce que tu es devenu, ta gentillesse et ta spontanéité..
- KHASSAL Mohammad pour tout ce qu'on a déjà fait ensemble et surtout tout ce qu'il nous reste à faire. .
- KHASSAL̄ Said pour ta générosité et surtout pour l'article 4... du droit civil..
- soujoud Imad ainsi que toute ta famille pour toutes les valeurs que nous partageons...
- A AIT EL MOUEDENE Abdelmajid pour notre amitié..
- A AIT MEZAN Kamal pour notre amitié..
- A la présidente du CEM basma, ainsi qu'à tous les autres membres... je suis fière de vous..
- A tous le staff de l'école RYAD EL FAYHAE et a tous les profs des cours de soutiens, MMe NEJARI, redwane,mostafa..etc ..

Liste des abréviations

- ARF : Activation-Résorption-Formation
- BC : Buffy Coat
- BMP : Bone Morphogenetic Proteins
- BMU : Bone Modelizing Unit (Unité de Remodelage Osseux)
- CFU-F : Colony Forming Unit Fibroblastic
- CFU-GM : Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage
- CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
- DCPD : Phosphate Dicalcique Dihydraté
- DOPC : Determinal Osteogenic Precursor Cells
- FGF : Fibroblast Growth Factors
- GDF : Growth Differentiation Factors
- GH : Growth Hormone
- GH-RH : Growth Hormone Releasing Hormone
- IGF : Insulin-like Growth Factor
- MAPC : Multipotent Adult Progenitor Cells
- Max : Maximum
- Min : Minimum
- MSC : Mesenchymal Stem Cells (Cellule souche mésenchymateuse)
- Nb : Nombre
- OP1 : Osteogenic Protein-1
- PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
- PTC : Phosphate Tricalcique
- RhBMP : Bone Morphogenetic Proteins recombinante humaine
- TGF- β : Transforming Growth Factor beta.
- UTCT : Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire

Liste des figures :

- **Figure 1** : Tibias de mouton . Défect de 3 cm comblé par :
 - (A) Endobon ;
 - (B) Endobon + rhBMP7 ;
 - (C) Endobon + moelle totale
- **Figure 2** : Etapes de la consolidation
- **Figure 3** : Histologie d'une unité de remodelage osseux.
- **Figure 4.** Coupes histologiques de tissu osseux trabéculaire d'os humain.
 - A. Coloration trichrome de Goldner × 250. Deux ostéons en cours de remodelage se font face sur une travée : ils ont été coupés au niveau de leur séquence de formation (en haut) et de résorption (en bas). 1. Os trabéculaire; 2. tissu ostéoïde; 3. site de formation ; 4. moelle ; 5. site de résorption ; 6. vaisseau.
 - B. Lumière polarisée, coloration au bleu d'aniline × 250. À la fin d'une séquence de remodelage, un ostéon en forme de croissant est formé. Noter l'aspect lamellaire du collagène. 7. Ostéon ; 8. lignes cémentantes.
- **Figure 5** : Consolidation par passage direct des ostéons
- **Figure 6** : L'ostéosynthèse par plaque est statique. sa raideur ne varie pas pendant toute la durée de la consolidation.
- **Figure 7** : Le nouveau concept propose un enclouage initial non verrouillé pour stimuler le cal périosté par une légère instabilité, suivi d'un verrouillage vers la sixième semaine pour stabiliser le foyer, et éventuellement d'un déverrouillage tardif pour renforcer le cal. Ce concept ne peut s'appliquer que si le rétablissement de la longueur n'impose pas un verrouillage immédiat
- **Figure 8** : Délais de consolidation pour différents os du squelette humain
- **Figure 9:** *Modèle expérimental de pseudarthrose (D-F) et de consolidation (A-C) chez le rat*
- **Figure 10** : Blastocyste
- **Figure 11** : Characteristic morphology of sorted BM MSCs with long projections, which is reminiscent of BM adventitial reticular cells

- **Figure 12** : Théorie déterministe
- **Figure 13** : Théorie instructive
- **Figure 14** : Théorie stochastique (50)
- **Figure 15** : Différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique. Les ostéoblastes se différencient à partir d'un précurseur mésenchymateux, situé dans la moelle osseuse ou à la périphérie des vaisseaux ou circulant, qui peut aussi se différencier en cellule musculaire squelettique, adipocyte, chondrocyte ou fibroblaste par le jeu de l'expression de différents facteurs de transcription (en italique). Osterix (*Osx*) agit en aval de *runx2* qui induit un phénotype ostéoblastique

- **Figure 16** : Principe du brassard de Sarmiento
- **Figure 17** : Repair of a large bone defect in the humerus of a 22-year-old patient by autologous BM stromal cells. A) Film obtained before surgery.

Liste des photos

- **Photo 1:** Aspect en microscopie électronique à balayage de la structure d'une corticale de fémur sectionnée transversalement à la diaphyse. Noter que, dans la partie externe de la corticale des canaux de Havers qui constituent l'axe longitudinal des ostéons sont coupés transversalement, indiquant l'orientation de ceux-ci. À la face profonde de la corticale, noter la présence de tissu osseux trabéculaire.

Dessin 1 : Structure du tissu osseux. Le tissu osseux comprend l'os trabéculaire et l'os cortical, qui est le résultat de la juxtaposition d'ostéons cylindriques centrés par un canal qui contient des vaisseaux. Il est nourri par le périoste richement vascularisé.

1. Ostéon ; 2. Canal de Wolkman ; 3. Canal de Havers ; 4. Innervation périostée ; 5. Vascularisation périostée ; 6. Périoste ; 7. Os sous-périosté ; 8. Os cortical ; 9. Os trabéculaire.

- **Photo 2:** comblement de la fente fracturaire par de l'os immature
- **Photo 3:** ponction de moelle osseuse
- **Photo 4:** recueil et contrôle de a moelle par le technicien
- **Photo 5:** centrifugeuse COBE 2991
- **Photo 6:** séparateur de cellules COBE 2291
- **Photo7:** réinjection du concentré médullaire sous contrôle radioscopique

Liste des tableaux

- **Tableau 1:**Cal osseux et environnement
- **Tableau 2:** Facteurs de croissance osseux et action cellulaire
- **Tableau 3:** Propriétés des greffons osseux autologues
- **Tableau 4:** Comparatif des études d'injection percutanée de moelle osseuse dans les retards de consolidation et pseudarthroses

SOMMAIRE

INTRODUCTION

HISTORIQUE ET GENERALITES

1- Processus de réparation osseuse

1.1 Consolidation de l'os cortical de l'adulte sous traitement orthopédique

1.1.1 Les différents stades de la consolidation : vue générale

1.1.2 Période d'union : de la fracture au tissu de granulation

1.1.3 Cal mou ou cal primaire

1.1.4 Cal dur

1.1.5 Remodelage

1.1.6. Le modelage :

1.1.7 Biomécanique du cal

1.1.8 Avantages/ inconvénients du traitement orthopédique

1.2 Processus de réparation de l'os cortical chez l'adulte au cours du traitement chirurgical

1.2.1 Ostéosynthèse par plaque vissée

1.2.2 Ostéosynthèse par enclouage centromédullaire à foyer fermé

1.2.3 Ostéosynthèse par fixateur externe

1.3 Processus de réparation de l'os chez l'enfant

1.4 Facteurs influençant la consolidation des fractures

2- Les échecs de la consolidation : les Pseudarthroses

2.1 Définition et fréquence des retards de consolidation et pseudarthrose

2.2 Classification

2.3 Histologie

2.4 Physiopathologie : facteurs influençant les pseudarthroses

3- Moelle osseuse, cellules souches et facteurs de croissance

3.1 Cellules souches

3.1.1 Définition

3.1.2 Origines

3.1.3 Localisation des cellules mésenchymateuses

3.1.4. Les cellules du stroma de la moelle osseuse

3.1.5 Evolution cellulaire au cours de l'induction ostéogénique

3.1.6 Expansion cellulaire des cellules souches ou non

3.1.7 Cellules souches de la moelle osseuse et ostéogénèse

3.2 Facteurs de croissance

3.2.1 Facteurs de croissance et pseudarthrose

4- Les techniques thérapeutiques des pseudarthroses

4.1 Les techniques d'ostéosynthèse

4.2 Les greffes osseuses

4.3 Les facteurs de croissance

4.4 Les céramiques de phosphate de calcium

4.5 Les procédés physiques

5. la thérapie cellulaire : La technique de ponction concentration réinjection d la ME

5.1 Ponction

5.2 Concentration des cellules mononucléées

5.3 Réinjection du concentré médullaire

6. Analyse de la méthode opératoire

6.1 La ponction de la moelle osseuse

6.2 La concentration médullaire

7. Principaux résultats des essais cliniques de l'injection de la moelle osseuse dans les problèmes de consolidation osseuse

7.1 Place de la greffe médullaire dans l'arsenal thérapeutique des pseudarthroses

8-CONCLUSION

INTRODUCTION

La moitié de la population sera amenée à consulter un chirurgien pour la prise en charge d'une fracture au cours de sa vie, une sur dix nécessitera une hospitalisation. Le chirurgien, lors de la prise en charge initiale des fractures, applique un certain nombre de techniques visant à promouvoir la consolidation. Dans la majorité des cas, la stabilisation du foyer de fracture va permettre la consolidation osseuse qui se définit comme le phénomène physiologique menant à la formation d'un cal au niveau d'un foyer de fracture.

Ce cal contient très précocement les cellules qui, en se différenciant, participent à l'évolution du foyer. Recrutées grâce à des protéines d'activation dès l'apparition d'un hématome, elles le transforment en un tissu fibreux, puis cartilagineux avant de le calcifier.

Dans la grande majorité des cas, assurer la stabilité du foyer de fracture suffit à permettre ce phénomène physiologique. Dans certains cas pathologiques, la consolidation ne parvient pas à son terme, souvent à cause d'une vascularisation médiocre secondaire à des facteurs locaux (fractures ouvertes, comminutives), régionaux (lésion des parties molles, lésion vasculaire) ou généraux (diabète, artérite, tabagisme..).

Une pseudarthrose est le nom donné à une absence définitive de consolidation. En pratique il s'agit d'un retard de consolidation supérieur au double du délai communément admis. Ainsi pour la jambe, pourvoyeuse importante de pseudarthroses, le délai habituel de consolidation est de 3 mois. Le diagnostic de pseudarthrose pourra être envisagé en l'absence de signes de consolidation 6 mois après le traumatisme.

Lorsque la faillite de la consolidation est établie voire suspectée, le traitement a pour but de relancer le processus d'ostéogenèse.

Il existe pour cela des moyens fiables mais relativement lourds et grevés d'une certaine morbidité : des gestes au niveau du foyer de fracture et des gestes d'apport osseux.

La nécessité de travailler à foyer ouvert, voire de trouver un site de prélèvement peut se compliquer de lésions vasculaires, de greffes septiques, de douleurs ...

De ce fait plusieurs axes de recherche se sont orientés vers la conception de traitements alternatifs.

Durant la dernière décennie, la recherche clinique a été considérablement stimulée par l'apparition de nouveaux outils. Les techniques en cours de développement s'intéressent aussi bien à l'aspect préventif que curatif de ces défauts de ré-ossification.

Il s'agit principalement de techniques :

- **Physiques** : stimulation mécanique, ultrasons, électrodes, . . .
- **Biologiques** : thérapies génique, cellulaire et par biomatériaux.

Toutes ces techniques n'ont pour l'instant pas remplacé l'autogreffe d'os spongieux, traitement de référence, auquel elles doivent être comparées lors des essais cliniques.

Au-delà des différences techniques il semble se dégager deux approches du défaut de réponse cellulaire : la stimulation in situ des cellules du renouvellement osseux et leur remplacement.

De ce fait, nous avons décidé de réaliser notre thèse sous le thème « application de la thérapie cellulaire dans le traitement des défauts de consolidation osseuse » afin d'éclaircir cette méthode, de mettre en exergue ses apports et d'étaler les résultats des études réalisées sur le sujet.

HISTORIQUE ET GENERALITES

Les capacités ostéogéniques des greffes de moelle osseuse totale sont étudiées chez l'animal depuis le milieu du XIXème siècle. Les premiers travaux cités sont ceux de Goujon (6) qui montre, en 1869, que la transplantation chez le lapin de moelle osseuse rouge en site ectopique engendre la production d'os.

En 1940, Levander (8) met à son tour en évidence l'influence de la moelle dans la régénération osseuse. Il implante en sous-cutané chez le lapin des transplants autologues de moelle osseuse et constate une ostéoformation. Il rapporte que cette néoformation osseuse n'est pas due à la moelle implantée elle-même, mais aux tissus mésenchymateux situés en périphérie, qui ont été induits à se transformer en tissu osseux par une substance ostéogénique produite par la moelle.

En 1945, Lacroix (7) dénomme cette substance *l'ostéogénine*.

En 1948, Pfeiffer (8) constate le même phénomène d'ostéoformation en implantant de la moelle osseuse totale de souris dans la chambre antérieure de l'œil de souris de même fond génétique.

Urist et McLean (10) reproduisent ces résultats en 1952.

En 1965, Richany (11) montre que l'ablation de la moelle osseuse fémorale ralentit la consolidation de fractures diaphysaire du fémur chez le chat.

En 1947 Phemister (12) décrit Chez l'homme une technique de traitement des pseudarthroses par simple apport et apposition d'os spongieux autologue sans enlever le tissu fibreux. Il constate une consolidation et montre que cette reconstruction est due à la moelle rouge.

En 1964 (14), puis en 1966 (86), Burwell implante chez la souris un composite associant une homogreffe spongieuse à une autogreffe de

moelle osseuse rouge. Il conclut que l'ajout de moelle autologue potentialise les capacités d'ostéoformation de l'homogreffe spongieuse.

En 1968 Friedenstein (43) implante de la moelle osseuse totale de souris sous la capsule rénale de souris de même fond génétique. Ces implants engendrent une néoformation osseuse dans 75 % des cas. Il conclut que la moelle osseuse contient des précurseurs de cellules ostéogéniques déterminés, les préostéoblastes, qui ne nécessitent pas de facteurs d'induction pour donner du tissu osseux et d'autres cellules, issues de la lignée hématopoïétique, dont l'expression des potentialités ostéogéniques nécessite une induction.

Nade (86), en 1970, implante chez le lapin en zone intramusculaire, une allogreffe décalcifiée associée à de la moelle osseuse totale autologue. Il conclut que la moelle osseuse augmente les capacités d'ostéoformation de l'os décalcifié. Ces travaux font suite à ceux de Urist (103) qui, en 1965, met en évidence les capacités d'ostéoinduction de l'os cortical déminéralisé à l'acide chlorydrique (0,6 molaire). C'est à partir de cette poudre d'os déminéralisé, *demineralized bone matrix* (DBM), que les *bone morphogenetic protein*, protéines ostéo-inductrices ou facteurs de croissance osseux, allaient être mises en évidence.

En 1972 Plenk [103] chez le rat puis Salama (111) en 1973 chez le lapin associent, quant à eux, une xéno greffe corticospongieuse de veau partiellement déprotéinisée, le *Kiel Bone* (B Braun) à une autogreffe de moelle osseuse totale et aboutissent aux mêmes conclusions : la moelle osseuse potentialise les capacités d'ostéoformation de la xéno greffe.

En 1982 Takagi et Urist (122) mettent quant à eux en évidence les capacités d'ostéo-induction de la moelle osseuse totale associée à la BMP en intraosseux chez le rat.

En 1986 Paley (96) comble un défaut de 1 cm sur le radius par 2 cm³ de moelle osseuse totale fraîche autologue. Il constate que la greffe de moelle permet d'obtenir une reconstruction osseuse et conclut qu'il s'agit d'une procédure simple, mini invasive, dont les applications cliniques potentielles sont non négligeables.

En 1991 pour Connolly (19) l'injection de moelle osseuse totale fraîche autologue permet d'obtenir la consolidation de pseudarthroses

atrophiques du tibia dans 18 cas sur 20 ; dans 20 cas sur 20 pour Garg (42) en 1993, dans 28 cas sur 35 pour Hernigou et Beauhan en 1997 (50), puis dans 53 cas sur 60 toujours pour Hernigou (51), dans la continuation de la même étude huit ans plus tard. Alors que Connolly réinjecte directement la moelle osseuse prélevée (17,22), Hernigou réalise une centrifugation de 5 minutes à 1200 g afin d'éliminer les polynucléaires et les cellules anucléées (globules rouges, plaquettes) et d'obtenir un concentré de cellules mononucléées pour la réinjection.

En 1997 aussi Hernigou (50) suggère que le succès de ces injections de « moelle concentrée » est directement relié au nombre de cellules ostéoprogénitrices injectées. En effet, il relie les échecs à un nombre moindre de *colony forming unit fibroblast* (CFUF) dans la préparation de moelle, i.e., à une moelle moins riche en cellules souches mésenchymateuses.

En 1999, Louisia (72), conclut que la moelle osseuse augmente l'ostéogénèse, et permet la consolidation et favorise la résorption du corail dans les pertes de substance osseuse.

En 2000 Bareille (2) montre la formation d'un tissu osseux de type lamellaire en site ectopique chez la souris après implantation d'une greffe composée de céramique d'hydroxyapatite d'origine bovine, l'*Endobon* (Biomet) et de moelle osseuse totale humaine.

En 2003 Den Boer (27) utilisant également l'*Endobon*, compare les effets de la moelle totale à ceux de la BMP7 recombinante (*rhBMP7*) chez le mouton. Il crée un défaut osseux de 3 cm dans la diaphyse tibiale, fixe le tibia à l'aide d'un clou centromédullaire et comble la perte de substance en comparant quatre groupes :

- une autogreffe d'os spongieux de 10 ml ;
- *Endobon* en granules (10 ml) ;
- *Endobon* + 2,5 mg de *rhBMP7* sur une éponge de collagène bovin (*Stryker Biotech*) ;
- *Endobon* + 10ml de moelle osseuse autologue prélevée dans le tibia opéré.

Chaque groupe contient huit animaux. Après 12 semaines, les radiographies montrent une consolidation complète et un aspect radiographique identique de tous les tibias dans les trois groupes

autogreffe, *Endobon* + *rhBMP7* et *Endobon* + moelle osseuse totale (Fig. 1). Les tests de torsion et de compression ainsi que les examens histologiques ne montrent pas de différence significative entre ces trois groupes. Dans le groupe *Endobon* seul, les tibias ne sont pas consolidés. L'auteur conclut que la moelle osseuse et la *rhBMP7* ont un effet d'ostéoinduction identique, qui permet à la biogreffe constituée par leur ajout à une céramique, d'égaliser les performances de l'autogreffe d'os spongieux.

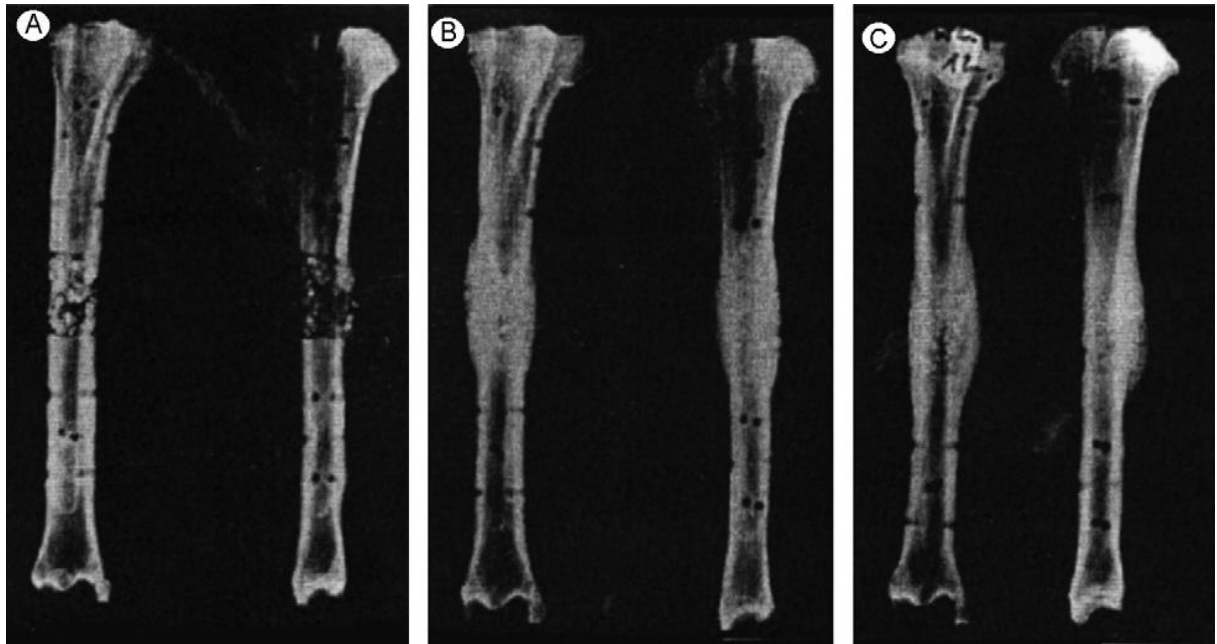


Figure 1 : Tibias de mouton [27]. Défect de 3 cm comblé par : (A) *Endobon* ; (B) *Endobon* + *rhBMP7* ; (C) *Endobon* + moelle totale.

En 2004, Borden (9) évalue une nouvelle matrice de microsphères synthétiques à base d'acide polylactique glycolique. Il implante cette matrice dans des défauts osseux de 15mm créés dans des cubitus de lapin soit seule, soit en association avec des cellules de moelle osseuse autologue, soit avec de la *rhBMP7*, soit avec des cellules de moelle et de la *rhBMP7*.

La triple association matrice microsphérique/cellules de moelle/*rhBMP7* donne non seulement le meilleur taux de formation osseuse mais aussi un os mature, lamellaire, et ce, en moins de six semaines. L'auteur conclut que ce nouveau système d'ingénierie tissulaire est très prometteur : la matrice microsphérique est ostéoconductrice et sa structure fait que les cellules et les facteurs de croissance associés peuvent y être incorporés.

Ainsi, toutes ces études, animales et humaines, dont les premières remontent au xixe siècle, suggèrent fortement que la moelle osseuse

totale possède un haut niveau d'ostéogénicité, qu'elle soit utilisée en site ectopique ou osseux, isolément, ou en association avec une allogreffe, une homogreffe, une xéno greffe déprotéinisée, une céramique de synthèse ou naturelle, un os déminéralisé ou une BMP synthétique ou naturelle. Malgré cela, l'utilisation de la moelle osseuse totale autologue n'est pas généralisée.

1. Processus de réparation osseuse:

1.1 Consolidation de l'os cortical de l'adulte sous traitement Orthopédique.

La consolidation osseuse est un processus qui aboutit à la réparation du tissu osseux après une fracture, une ostéotomie, une arthrodeuse ou une greffe osseuse.

La consolidation est un phénomène naturel qui procède en deux grandes étapes. La première est la période d'union au cours de laquelle l'os retrouve sa continuité anatomique ; suivie par la période de remodelage-modelage qui est beaucoup plus longue, elle restitue l'os dans sa forme, sa structure et sa résistance d'origine.

La première période se déroule en trois stades : le stade **d'hématome**, suivi rapidement par la constitution du tissu de granulation ; **le cal mou** ou primaire, puis **le cal dur**. La deuxième période compte deux stades : **le remodelage** puis **le modelage**. Ainsi, la consolidation se déroule au total en cinq stades (81).

1.1.1 Les différents stades de la consolidation : vue générale

– **la fracture**; caractérisée par la formation d'un hématome local suivi rapidement d'une réaction inflammatoire locale aboutissant à un tissu de granulation qui dure environ 2 à 3 semaines ; c'est la réaction cellulaire initiale. Le cal se développe ensuite sur une période de 1 à 4 mois.

– **le cal mou** : pendant cette phase les tissus qui unissent les fragments osseux ne sont pas minéralisés ou ne le sont que partiellement ; Il n'y a pas de solidarité mécanique. Sous le périoste, le tissu de granulation se transforme en substance ostéoïde sur chaque fragment et en cartilage au niveau du foyer. Le cartilage évolue et se minéralise. Cette phase expectative est caractérisée par la fragilité et la réversibilité de la production d'un tissu mou de cicatrisation temporaire appelé cal primaire

– **le cal dur** est obtenu par minéralisation du cal mou ; un pont osseux apparaît et rétablit une solidarité mécanique entre les fragments. L'os

immature se transforme en quelques semaines en os dur, lamellaire primaire qui assure l'union et la solidité mais dans lequel l'orientation des systèmes de Havers est multidirectionnelle, l'union est acquise, l'os reste encore cicatriciel mais il est solide;

– **la période de remodelage**: le remodelage restitue à l'os sa structure originelle; l'os lamellaire secondaire, orienté longitudinalement de façon classique, remplace l'os lamellaire primaire. Ce processus dure environ 2 ans et rend à l'os sa structure histologique habituelle. le cal dur est remplacé par un os haversien bien orienté.

La période de modelage elle est, dans son mécanisme, différente du remodelage ; elle rend à l'os sa forme initiale, avec réapparition du canal médullaire.

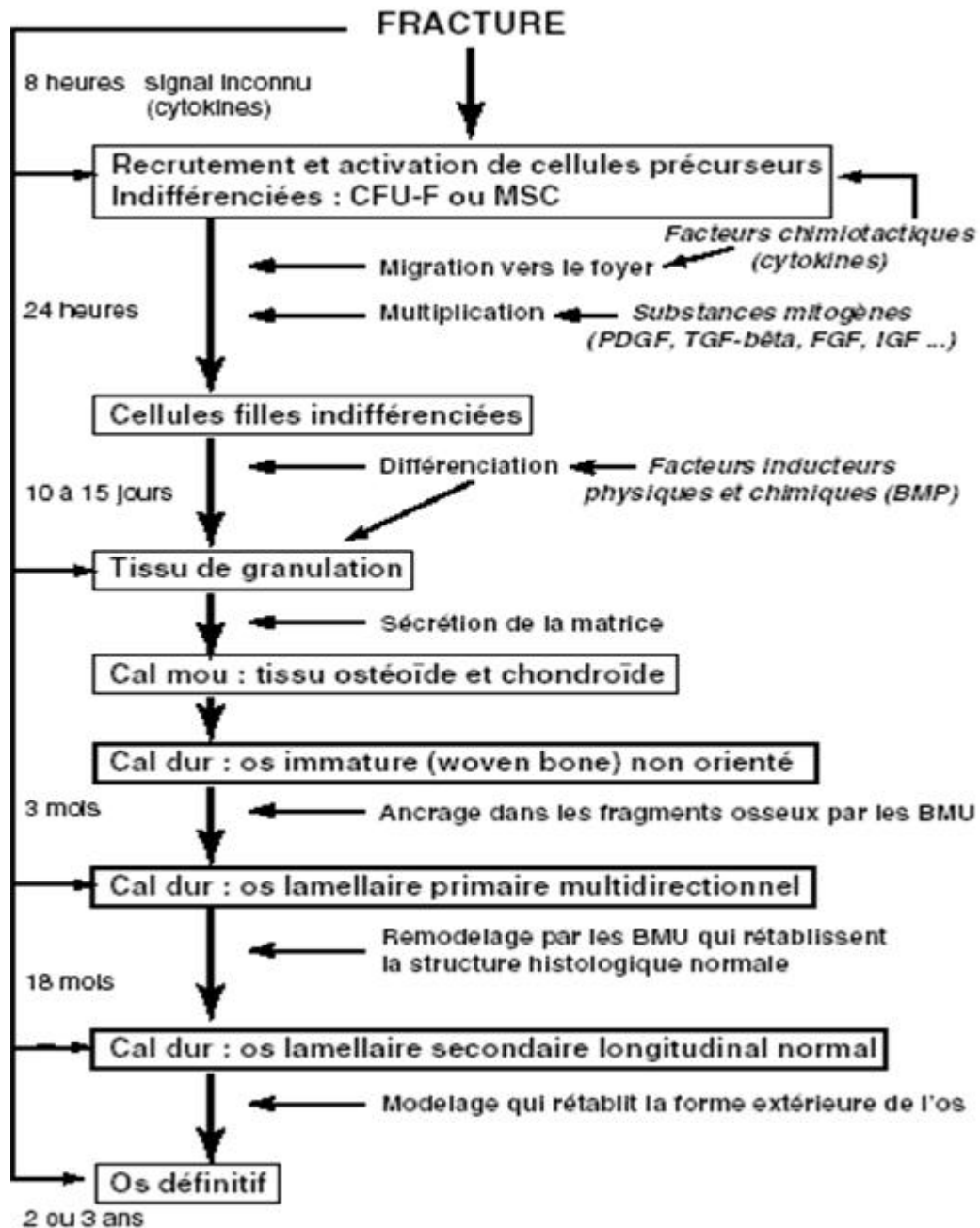


Figure 2 : les étapes de la consolidation(81)

1.1.2 Période d'union: De la fracture au tissu de granulation.

Le traumatisme provoque un saignement des extrémités fracturaires et des parties molles environnantes. Le caillot sanguin se forme rapidement et on assiste, au sein des tissus péri fracturaires, à l'initiation d'une réaction inflammatoire aiguë et la formation d'un hématome.

Parmi les conséquences des différentes lésions formées au niveau du périoste, de la moelle, de la corticale et des parties molles, il y a les

atteintes cellulaires; qui sont selon Frost *et al* (38) mortes ou endommagées de telle sorte qu'elles deviennent susceptibles de mieux répondre aux messagers locaux et généraux et aux stimulations. Il est probable, en fait, que le traumatisme cellulaire entraîne la production de cytokines chimiotactiques. La nature exacte des signaux qui déclenchent les mécanismes de la consolidation sont peu à peu élucidés.

Hématome fracturaire:

L'expérience la plus intéressante concernant le rôle et les propriétés de l'hématome dans la consolidation des fractures est probablement celle de Mizuno *et al.* (82). Les auteurs ont transplanté l'hématome fracturaire au deuxième et au quatrième jour après la fracture, en sous-périosté et dans un muscle. L'hématome transplanté au deuxième jour produit de l'os nouveau par ossification enchondrale, dans le site sous-périosté, mais pas dans le site musculaire. L'hématome transplanté au quatrième jour produit de l'os dans les deux sites, sous-périosté et intramusculaire. Au deuxième jour, l'hématome isolé ne possède donc pas de potentiel ostéogénique. Le périoste fournit en revanche à l'hématome les éléments nécessaires pour que leur association ait un pouvoir ostéogène. Au quatrième jour, le caillot isolé a acquis un pouvoir ostéogénique ; il est ostéo-inducteur puisqu'il forme de l'os, même dans le muscle, il contient des cellules ostéoformatrices et tous les facteurs nécessaires.

En 2007, Oe *et al* (92) ont mis en évidence *in vitro* la présence de progéniteurs osseux au niveau de l'hématome post fracturaire. Au sein de l'hématome, l'extraordinaire prolifération des vaisseaux péri osseux forme ce que Rhinelande appelle la vascularisation extra osseuse ; elle est responsable de la restauration de la continuité vasculaire dont l'interruption avait été proportionnelle à l'énergie de l'impact et au déplacement des fragments. Street *et al* (121) ont mis en évidence dans l'hématome une cytokine angiogénique : VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ; elle est responsable de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et de modifications cellulaires dans la moelle osseuse.

Ainsi, Lors de la régénération tissulaire, le microenvironnement est probablement fondamental, comme il l'est lors de l'embryogenèse [45]. A la différence du modèle de croissance des membres de certains vertébrés, les gradients de diffusion de certaines molécules (facteurs de croissance, nutriments, déchets) y jouent un rôle probablement plus important que l'information positionnelle apportée par les gènes lors du développement (Hox par exemple). Ceci pourrait expliquer par exemple des cinétiques d'ossification différentes au sein d'un cal, en fonction de la situation au sein de ce foyer.

Ainsi si la concentration en Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est importante dès la phase initiale de l'hématome, son action angiogénique ne prend place que quelques jours après, lorsque la concentration en potassium permet à nouveau la survie cellulaire [43]. Différentes cellules jouent un rôle dans la genèse d'une réaction inflammatoire qui s'installe en quelques heures dans les tissus péri-fracturaires ; des histiocytes et des macrophages apparaissent afin de détruire les débris et des ostéoclastes érodent les surfaces osseuses. Il existe donc un processus complexe qui va être déclenché immédiatement après la fracture mais dont le signal est encore inconnu.

Phénomène régional d'accélération RAP (regional acceleratory phenomenon)

Ce processus recrute des cellules précurseurs, les multiplie, assurent leur différenciation en ostéoblastes, ostéoclastes, fibroblastes et contrôle la minéralisation, le remodelage puis le modelage. Frost (40) a été le premier à introduire cette notion.

Ce processus est défaillant dans un peu moins de 3 % des fractures, ce qui entraîne une absence de consolidation.

En effet, si la consolidation ne se faisait que par les ostéoblastes au niveau de la fracture, elle nécessiterait entre 200 et 1 000 ans ! Or, ces cellules ne vivent que 2 à 3 mois ; Il faut donc un mécanisme qui recrute des cellules précurseurs assurant leur activation-différenciation-organisation et qui contrôle l'existence, la vitesse, la quantité, la localisation et la durée de la consolidation.

Ce processus commence immédiatement après la fracture, atteint son maximum entre le premier et le deuxième mois et disparaît du sixième au 24ème mois ou plus tard, à la fin du remodelage.

Au total, le **RAP** (Regional Acceleratory Phenomenon) constitue le processus **recrutement migration-prolifération** des cellules ostéoprogénitrices.

Recrutement de cellules précurseurs

Il débute dans les 8 premières heures par le recrutement de cellules précurseurs des ostéoblastes, le signal n'étant pas connu. L'origine de ces cellules, activées à la surface de l'os du côté médullaire comme de la couche profonde du périoste, est sujet à controverses.

Deux théories s'affrontent quant à l'origine des cellules précurseurs des ostéoblastes:

- *La « spécialisation cellulaire »* : pour les partisans de cette théorie tels que Ham *et al* (47), il existe dans la moelle et à la surface de l'os, dans la couche profonde du périoste, des cellules prédéterminées.

- *L'induction ostéogénique* : les cellules précurseurs sont des cellules non ostéoformatrices qui développent une potentialité ostéogénique en présence d'un stimulus approprié (125).

Pour Friedenstein *et al* (50) il existe dans la moelle des cellules ostéoformatrices, les

Determinal osteogenic precursor cells (COPC) qui ressemblent à des fibroblastes. Les recherches de Brighton et Hunt en 1991 (12) confirment le rôle important de la moelle dans l'origine des cellules précurseurs. Ils ont constaté la multiplication de cellules mésenchymateuses polymorphiques dans la moelle au contact du foyer, dans les 24 heures qui suivent la fracture. Ces cellules viennent de la transformation des cellules endothéliales des capillaires et donnent naissance, dès la 24e heure, à des ostéoblastes.

Donc en conclusion; ces cellules pourraient provenir soit de l'activation de cellules prédéterminées vers la voie ostéogénique, soit de l'induction vers cette voie de cellules (notamment endothéliales) ne possédant normalement pas cette capacité. Il semble que cette hypothèse d'ostéo induction soit la plus acceptée actuellement (81).

L'induction ostéogénique se produit indiscutablement dans La moelle osseuse mais aussi dans la couche profonde du périoste. Ainsi, les expériences d'ablation totale du périoste, qui se traduisent par une absence totale de cal externe périosté en attestent. Les expérimentations ont montré qu'il existe probablement aussi des cellules précurseurs dans des sites ectopiques comme la musculature péri vertébrale. La quantité de cellules précurseurs dans la moelle est relativement peu importante : une pour 100 000 cellules nucléées. Une insuffisance du nombre de cellules précurseurs médullaires semble pouvoir jouer un rôle dans la survenue des pseudarthroses. Nous ignorons encore si ces cellules précurseurs jouent un rôle au cours des phases tardives de la consolidation.

Migration

Les cellules précurseurs indifférenciées recrutées vont migrer vers le foyer de fracture. Des facteurs chimiotactiques libérés par les cellules nécrotiques stimulent cette migration.

Prolifération cellulaire

Elle succède au recrutement et à la migration. A ce jour, les cellules précurseurs ne sont pas individualisables morphologiquement ou phénotypiquement [27]. En revanche, les colonies auxquelles elles donnent naissance sont facilement isolées. Chaque colonie cellulaire dérive d'une seule cellule initiatrice appelée colony forming unit fibroblastic ou CFU-F. Des auteurs comme Einhorn *et al* (33) parlent de mesenchymal stem cell ou MSC.

Quel est le mécanisme de cette multiplication cellulaire?

Les cellules lésées par la fracture libèrent rapidement de nombreux messagers chimiques que l'on peut mettre en évidence dans l'hématome. Parmi les messagers se trouvent notamment des substances mitogènes qui vont agir sur les cellules précurseurs et entraîner leur multiplication rapide : la sécrétion par les plaquettes de platelet-derived growth factor (PDGF) et de transforming growth factor beta (TGF- β). L'action de ces substances mitogènes est limitée dans le temps. Les mitoses débutent à peu près 8 heures après l'accident et plafonnent au bout de 24 heures. Les cellules précurseurs ainsi proliférées vont se différencier grâce à des facteurs ostéoinducteurs chimiques et physiques

Différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire des cellules filles nées de la multiplication commence après ce délai.

Facteurs ostéoinducteurs:

On regroupe sous le nom d'inducteurs l'ensemble des facteurs biochimiques et biophysiques responsables de l'induction, c'est-à-dire de la différenciation des cellules précurseurs en cellules à potentialité osseuse. Ils orientent la différenciation vers les différents groupes cellulaires spécialisés : ostéoblastes, chondroblastes et fibroblastes.

Les facteurs ostéoinducteurs chimiques ou facteurs de croissance. (3.3)

De très nombreuses molécules agissant sur le métabolisme ont été mises en évidence dans le tissu osseux, mais leur nombre et la complexité de leurs interactions rendent difficiles tout travail de synthèse. Ces facteurs chimiques sont essentiellement des hormones, des facteurs locaux de croissance ou des cytokines du système immunitaire.

Antagonistes ou agissant en synergie, ils stimulent la formation osseuse ou au contraire favorisent la résorption.

Les facteurs locaux de croissance sont des polypeptides ; toujours présents en quantité notable dans la matrice osseuse. Leur action est présente en phase précoce ; l'ostéoinduction qu'ils produisent débute dès la 24e ou la 48e heure suivant la fracture. Ils agissent sur l'ostéogenèse à différents niveaux : recrutement de cellules indifférenciées, multiplication, différenciation, sécrétion de la matrice collagène.

Tous les facteurs de croissance présents dans la matrice sont synthétisés par les ostéoblastes, sauf les PDGF qui ont d'abord été mis en évidence dans les plaquettes avant d'être retrouvés dans un grand nombre de tissus. L'insulin-like *growth factor* (IGF) est également sécrété par de nombreux types cellulaires dont les ostéoblastes. Véhiculé par le sang, il présente à la fois une action locale et systémique. Tous ces facteurs jouent un rôle dans la réparation des fractures. Leurs actions sont plus ou moins complexes et donc plus ou moins clairement élucidées.

Les facteurs physiques

Les facteurs ostéoinducteurs physiques sont les contraintes mécaniques telles que les mouvements du foyer de fracture et la variation des potentiels électrocinétiques de l'os qui augmentent avec l'intensité des contraintes mécaniques.

A la différence des facteurs ostéo inducteurs chimiques, ils ne sont pas susceptibles d'engendrer du tissu osseux en site ectopique. Les stimulations mécaniques constituent un facteur physique essentiel. L'expérience montre qu'elles agissent pendant plusieurs semaines.

On sait par exemple qu'une mobilité modérée du foyer stimule le périoste pendant au maximum 5 à 6 semaines. Il a été montré que des micromouvements importants dans une petite perte de substance augmentent la formation osseuse, mais que, au contraire, ils la diminuent si la perte de substance est importante. Une charge mécanique induit, outre les effets mécaniques directs, des effets électriques secondaires.

On peut résumer les propriétés électriques de l'os comme suit :

- Des champs électriques locaux apparaissent dans le tissu osseux mort et sec soumis à une déformation. Ils ont pour origine les fibres de collagène qui sont piézoélectriques, c'est-à-dire deviennent électriquement polarisées lorsqu'elles sont soumises à une contrainte mécanique ;
- Un potentiel électrique biphasique a été mis en évidence dans l'os vivant soumis à des déformations. Il est dû à l'écoulement, à travers la matrice, des liquides extracellulaires contenant des sels à la concentration physiologique et donc eux-mêmes chargés. On parle

de potentiel électrocinétique ou streaming potential ; il s'agit donc d'un simple entrainement mécanique d'ions par écoulement des fluides.

- Les potentiels électrocinétiques dominant dans l'os humide ou les potentiels piézoélectriques ne sont pas enregistrables parce qu'ils sont compensés par un processus très rapide (10 microsecondes) de mouvements d'ions. L'importance des courants augmente avec l'intensité de la contrainte mécanique. Ces courants existent dans l'os vivant. Leur intensité augmente autour du foyer de fracture. Lorsque l'os est consolidé, les signaux reviennent à leur valeur normale, d'où l'hypothèse que les potentiels électriques produits constituent un signal pour la régulation des processus cellulaires lors de la consolidation osseuse. Neidlinger-Wilke *et al* (87) ont établi que les sollicitations mécaniques agiraient en définitive par production de facteurs de croissance, stimulés par un signal électrique

En définitive, 3 à 4 jours après la fracture, l'hématome fracturaire et le caillot contiennent une grande quantité de cellules déjà différenciées et de facteurs ostéo inducteurs. On comprend donc leur rôle essentiel et le risque que fait courir leur évacuation.

Tissu de granulation

« Les cellules précurseurs, sensibilisées et stimulées par les messages locaux, produisent de nouvelles cellules qui se différencient pour former de nouveaux vaisseaux, des fibroblastes, de la substance fondamentale et d'autres cellules. Collectivement, elles forment un tissu granuleux mou dans l'espace inter fragmentaire » (40) ; il s'agit d'un tissu fibrovasculaire (différenciation en fibroblaste et formation de nouveaux vaisseaux) riche en collagène de type III. La production de ce collagène est proportionnelle à l'importance de la réaction inflammatoire. A cette phase, un des points les plus marquants à ce stade qui dure 2 à 3 semaines est la non-participation des extrémités osseuses au phénomène puisqu'elles sont mortes, comme le prouvent des lacunes ostéocytaires. Cet os mort est plus ou moins étendu de part et d'autre du foyer ; en moyenne 1 centimètre pour une fracture diaphysaire et 1 millimètre pour une fracture spongieuse. Ainsi, alors qu'instinctivement on a l'impression que les deux extrémités vont s'unir pour former le cal, il est évident qu'au mieux, ces deux extrémités ne jouent qu'un rôle passif dans ce qui semble être la formation d'un pont entre les deux zones osseuses vivantes. Cette nécrose osseuse va être attaquée par les lysosomes des polynucléaires (1).

1.1.3 Cal mou ou cal primaire

Au stade de **cal primaire**, également appelé cal mou - Ce qualificatif signifie seulement que la continuité mécanique entre les fragments n'est pas encore rétablie- ce dernier va contenir du tissu osseux immature et du cartilage qui ne sont pas spécialement mous. Bien avant le rétablissement de cette continuité, le périoste a pour rôle d'immobiliser le foyer ; situation indispensable à la minéralisation. Le cal mou apparaît sur les fragments osseux dans le décollement du périoste. Il va former un manchon fibreux précurseur de la couche externe du périoste souple et fusiforme.

Sous le périoste, les cellules précurseurs se sont déjà différenciées en deux types de lignées cellulaires :

- **La lignée ostéoblastique** : à quelques millimètres du site de fracture, les cellules précurseurs se transforment en ostéoblastes qui élaborent une matrice organique appelée substance ostéoïde. Cette dernière contient des fibres collagènes de type I mais il reste encore du collagène de types III et V. La minéralisation de la substance ostéoïde produit très rapidement, sur chaque fragment et sous la couche fibreuse du périoste, un manchon d'os immature (woven bone) à travées obliques qui s'accroissent en s'écartant du foyer de fracture. La matrice osseuse ne contient plus alors que du collagène de type I. La formation d'os immature est limitée dans le temps. Chez l'homme, La substance va se minéraliser progressivement, formant un manchon d'os immature qui va cesser de croître vers la sixième semaine.
- **Une lignée de chondrocytes** : au plus proche du foyer de fracture et sous l'influence de la mobilité de celui-ci (facteurs physiques), les cellules précurseurs prennent une forme ronde, se transforment en chondrocytes et commencent à produire une matrice cartilagineuse riche en collagène de type II. Le cartilage apparaît en petits îlots entraînant la formation d'anneau cartilagineux sous-périosté autour du foyer. Ce processus est caractérisé par une minéralisation progressive du cartilage formé pendant cette étape.

La différenciation de ces deux lignées cellulaires se termine par la formation du cal périosté qui répond à l'existence d'une mobilité du foyer et n'est ainsi pas présent en cas d'ostéosynthèse parfaitement rigide; les corticales ne participent pas à la formation du cal, elles ont au mieux une action passive de pontage entre les extrémités osseuses vivantes. En

revanche la moelle osseuse est le lieu d'une ostéogenèse en bande située à la face interne de la corticale. 4 à 6 semaines après la fracture, la jonction des ponts d'ossification forme une lamelle osseuse ; cette écaille osseuse fragile est souvent visible sur les radiographies. La minéralisation se poursuit ensuite, progressant du manchon d'os immature vers le foyer. La création d'un pont inter fragmentaire est l'étape la plus importante.

Mécaniquement, le développement d'un cal périosté exubérant augmente la rigidité axiale en élargissant la surface de section au niveau du cal. Si les contraintes physiques qui s'exercent sur le foyer de fracture sont trop importantes, le manchon cartilagineux n'est pas assez rigide pour supprimer l'ostéoinduction physique vers la différenciation cartilagineuse. Le foyer reste fibro-cartilagineux et la consolidation ne se fait pas. L'évolution se fait vers la pseudarthrose. C'est ce qui se produit par exemple en cas d'appui répété intempestif sur un membre fracturé. On peut par ailleurs, bien que cela soit purement théorique, considérer que c'est la création de ce pont minéralisé assurant une solidarité mécanique entre les fragments qui marque le passage du cal mou au cal dur.

1.1.4. Cal Dur

La transformation progressive du tissu de granulation en tissu cartilagineux participe à la rigidification du foyer. Dès la fin de l'induction physique vers le phénotype chondrocytaire que représente le mouvement, les chondrocytes s'arrondissent, leur métabolisme s'orientant vers celui de l'ostéoblaste, ils relarguent alors du calcium ainsi que des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire et libèrent des facteurs nécessaires à l'ossification. Le cal dur est d'abord formé d'os immature non orienté de type trabéculaire ignorant complètement les contraintes mécaniques locales et générales. Ensuite il va se transformer en os lamellaire primaire, c'est-à-dire que les ostéons sont orientés dans toutes les directions suivant les lignes de contrainte(81), afin de rétablir une raideur idéale de l'os.

Cette transformation commence à la quatrième semaine. A 8 semaines et plus tard, cet os lamellaire primaire multidirectionnel pénètre dans les extrémités fracturaires. À 16 semaines, l'os immature a pratiquement disparu.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'expérience montre que la rigidification d'un foyer de fracture traité orthopédiquement n'est pas progressive. Plusieurs publications ont montré qu'elle augmente

brutalement à un moment donné. Le meilleur exemple est celui des fractures de l'humérus. Les patients perçoivent parfaitement la mobilité dans le foyer en dépit du plâtre ou de l'attelle, jusqu'au moment où, en un jour ou deux, cette sensation disparaît. Tout se passe comme si le cal « prenait » comme du ciment.

La radiologie ne permet pas toujours avec certitude d'affirmer la consolidation. Elle met en évidence en effet la quantité de cal mais pas sa qualité.

En cas de doute, la mesure de la raideur du foyer par des méthodes directes ou indirectes telles que les a proposées Marsh *et al* peut apporter la réponse. Il considère par exemple qu'un tibia est consolidé si sa raideur dépasse une valeur référentielle. (80).

1.1.5. Remodelage

Le remodelage se poursuit durant 18 mois et a pour but de rétablir une architecture histologique normale, le cal va continuer à évoluer pendant de nombreux mois. L'os lamellaire primaire à orientation multidirectionnelle va être remplacé progressivement par de l'os lamellaire secondaire dont les ostéons son

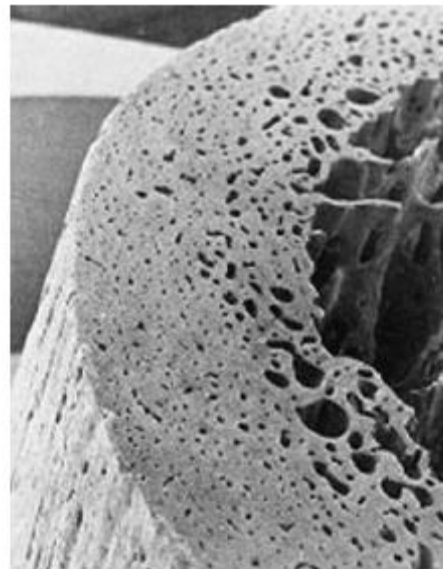
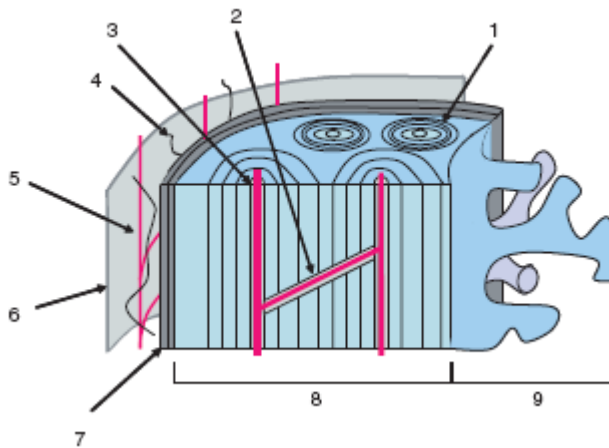


PHOTO 1 : Aspect en microscopie électronique à balayage de la structure d'une corticale de fémur sectionnée transversalement à la diaphyse. Noter que, dans la partie externe de la corticale des canaux de Havers qui constituent l'axe longitudinal des ostéons sont coupés transversalement, indiquant l'orientation de ceux-ci. À la face profonde de la corticale, noter la présence de tissu osseux trabéculaire.

DESSIN : Structure du tissu osseux. Le tissu osseux comprend l'os trabéculaire et l'os cortical, qui est le résultat de la juxtaposition d'ostéons cylindriques centrés par un canal qui contient des vaisseaux.

Il est nourri par le périoste richement vascularisé.

1. Ostéon ; 2. Canal de Wolkman ; 3. Canal de Havers ; 4. Innervation périostée ; 5. Vascularisation périostée ; 6. Périoste ; 7. Os sous-périosté ; 8. Os cortical ; 9. Os trabéculaire. Thomas T., Martin A., Lafage-Proust M.-H. Physiologie du tissu osseux. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-002-B-10, 2008.

Cette phase de reconstruction osseuse est le fait de l'action conjointe des ostéoclastes, issus de cellules souches hématopoïétiques, et d'ostéoblastes, l'ensemble constituant ce qui a été nommé par Frost les BMU (*Bone modelizing unit*) (40).

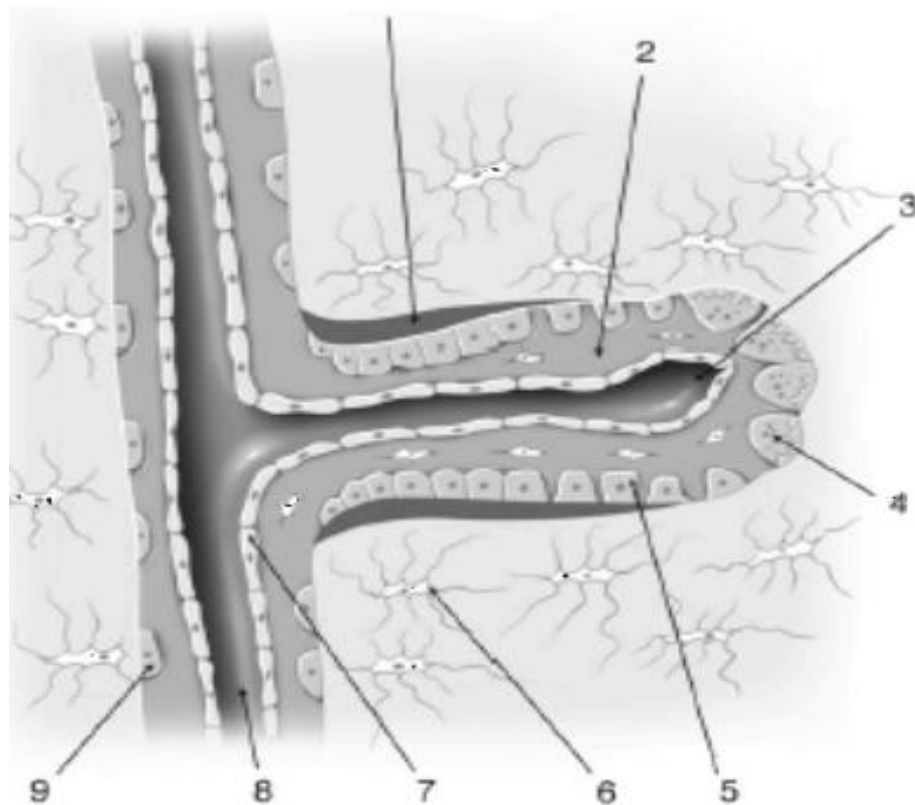


Figure 3 : histologie d'une unité de remodelage osseux (BMU). Dialètre du tunnel : 150 μ m ; vitesse de creusement du tunnel : 50 μ /j ; vitesse du dépôt de la matrice : 1 à 2 μ /j.

- 1- Ostéoblaste en activité
- 2- Conjonctif
- 3- Bourgeon capillaire axial
- 4- Ostéoclaste en activité
- 5- Matrice osseuse néoformée
- 6- Ostéocyte
- 7- Cellule endothéliale
- 8- Vaisseau
- 9- Ostéoblaste quiescent

Yann Macé 1

Service de rééducation et de réadaptation de l'appareil locomoteur et des pathologies du rachis, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Histologiquement, l'unité comporte une tête foreuse constituée par un ensemble d'ostéoclastes travaillant côte à côte au sommet hémisphérique d'un canal ; ils résorbent le tissu osseux dur. Les ostéoclastes coiffent un capillaire qui les suit dans leur progression à l'intérieur de l'os compact. Les vaisseaux sont eux-mêmes accompagnés de cellules qui se différencient en ostéoblastes. Ceux-ci déposent l'os en lamelles concentriques sur les parois du canal de résorption. Il se crée ainsi une structure de type haversien qui, dans l'os définitif, s'oriente en fonction des contraintes suivant la loi de Wolff. Dans les BMU, résorption et formation sont couplées dans l'espace et dans le temps.

Le fonctionnement se fait suivant une séquence répétitive appelée ARF : activation-résorption-formation. Le temps de vie d'un BMU est de 2 à 3 mois. Il faut noter qu'entre l'activation et la résorption existe un délai de 3 à 4 semaines dont il faut tenir compte dans certains modes de réparations fracturaires. Le couplage formation-résorption est un concept fondamental dont les bases cellulaires et les messagers sont mal connus.

1.1.6. Le modelage :

Survient tardivement, mettant en œuvre les mêmes populations cellulaires que le remodelage.

Il faut bien différencier modelage et remodelage. Le remodelage concerne la structure microscopique et le modelage concerne la forme générale de l'os.

Le résultat de ces deux dernières phases est l'obtention d'un os identique à l'os préfracturaire.

L'identité micro structurelle avec existence d'un os lamellaire est acquise à la fin du remodelage, un peu plus d'un an après le traumatisme ;

Le modelage comporte notamment la restauration du canal médullaire perturbé par la fracture. Le modelage dure plusieurs années. Il peut être complet chez l'enfant. Il est partiel chez l'adolescent et limité chez l'adulte, en particulier lorsque la fracture s'est consolidée avec un déplacement notable ; Le mécanisme du modelage n'est pas connu en détail

1.1.7 Biomécanique du cal :

Après la courte phase de formation du cal primaire, le périoste, les corticales et la médullaire vont participer à la formation du cal de manière diverse. Le périoste forme rapidement un cal relativement volumineux et immobilise le foyer de fracture. Le cal périosté peut combler une vaste surface de perte osseuse, il nécessite la présence de l'hématome et des tissus mous. Il est stimulé par une mobilité relative du foyer de fracture. La stabilité du foyer diminue sa capacité de formation. Au bout d'environ 6 semaines le cal périosté est fabriqué et le foyer est relativement stable ; ce qui permet au cal cortical de se construire. Celui-ci a besoin d'une immobilité parfaite du foyer de fracture. C'est le cal médullaire, de formation lente qui va pénétrer l'intervalle entre les corticales. Il n'est pas très sensible à la mobilité du foyer de fracture.

Type de consolidation	Vitesse	Pontage du foyer	Tolérance au mouvement	Tolérance à la rigidité	Importance des tissus mous
Cal primaire	++++	+	++++	++++	-
Cal périosté	+++	+++	+++	-	++++
Cal médullaire	++	++++ (lent)	++	+++	-
Cal Cortical	+	-	-	++++	-

Tableau 1 : Cal osseux et environnement (d'après Mc Kibbin)

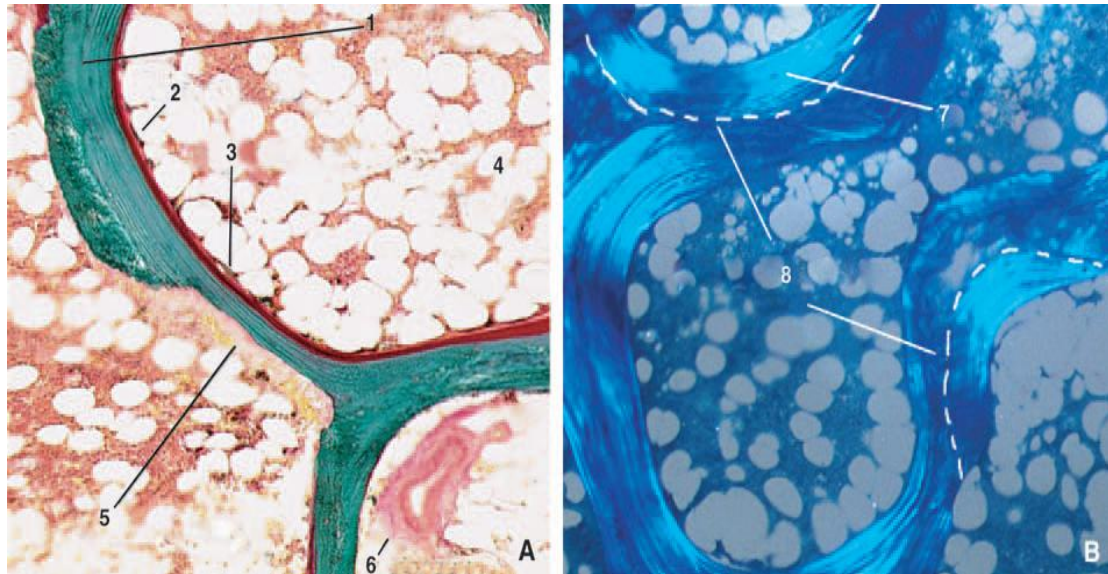


Figure 3. Coupes histologiques de tissu osseux trabéculaire d'os humain.

A. Coloration trichrome de Goldner $\times 250$. Deux ostéons en cours de remodelage se font face sur une travée : ils ont été coupés au niveau de leur séquence de formation (en haut) et de résorption (en bas). 1. Os trabéculaire ; 2. Tissu ostéoïde ; 3. Site de formation ; 4. Moelle ; 5. Site de résorption ; 6. vaisseau.

B. Lumière polarisée, coloration au bleu d'aniline $\times 250$. À la fin d'une séquence de remodelage, un ostéon en forme de croissant est formé. Noter l'aspect lamellaire du collagène. 7. Ostéon ; 8. lignes cimentantes.

1.1.8 Avantages / inconvénients du traitement orthopédique

Le traitement orthopédique a l'avantage de ne pas entraîner de risque d'infection et minimise les risques de pseudarthrose. Il a pour désavantage le risque d'une réduction incomplète du foyer de fracture et de déplacement secondaire exposant à un cal vicieux et donc un retentissement articulaire secondaire. L'immobilisation qui comprend l'articulation sus et sous-jacente induit des troubles trophiques et des raideurs articulaires nécessitant une rééducation longue.

1.2- Processus de réparation de l'os cortical chez l'adulte au cours du traitement chirurgical

1.2.1 Ostéosynthèse par plaque vissée

L'action la plus nocive de l'ostéosynthèse est l'ouverture du foyer de fracture. L'évacuation de l'hématome fracturaire, qui comprend les cellules précurseurs indifférenciées en cours de multiplication et les substances mitogènes puis les facteurs ostéoinducteurs (BMP, TGF...), va ralentir de façon considérable la production du cal osseux. Il est cependant possible de prélever l'hématome en début d'acte et de le remettre en place autour du foyer avant fermeture. Les lésions du périoste qui accompagnent l'ostéosynthèse supprime la formation du cal périosté et entraîne un nouveau type de consolidation. Les facteurs inducteurs mécaniques prennent alors une importance considérable. Dans la situation idéale, de laboratoire le plus souvent, où l'ostéosynthèse est franchement stable, la consolidation corticale ne passe pas par le stade de cal mou fibro cartilagineux. Si le contact inter fragmentaire est rendu parfait, comme ce peut être le cas avec la mise en place de plaques à compression, les têtes foreuses des BMU vont passer directement le foyer, d'une corticale à l'autre. Les ostéons agissent alors comme des chevilles fixant directement le foyer de fracture. Il ne s'agit donc pas d'un processus de cal mais plutôt de remodelage. Le délai de consolidation est de l'ordre de 4 semaines, période durant laquelle la fracture tient grâce aux qualités mécaniques du montage d'ostéosynthèse. Lorsqu'il existe un espace entre les fragments, la consolidation corticale se réalise par invasion du cal médullaire.

Fait d'os immature, le cal médullaire évolue vers une structure trabéculaire dense. L'ancrage de l'os immature est réalisé par des unités de remodelage osseux (BMU) venues de l'os immature et forant les extrémités des fragments de corticale. En pratique la consolidation se fait par l'association des deux mécanismes suscités. Le remodelage va se poursuivre durant 18 mois au minimum. C'est la raison pour laquelle le matériel d'ostéosynthèse ne doit pas être retiré sous peine de risque fracturaire accru.

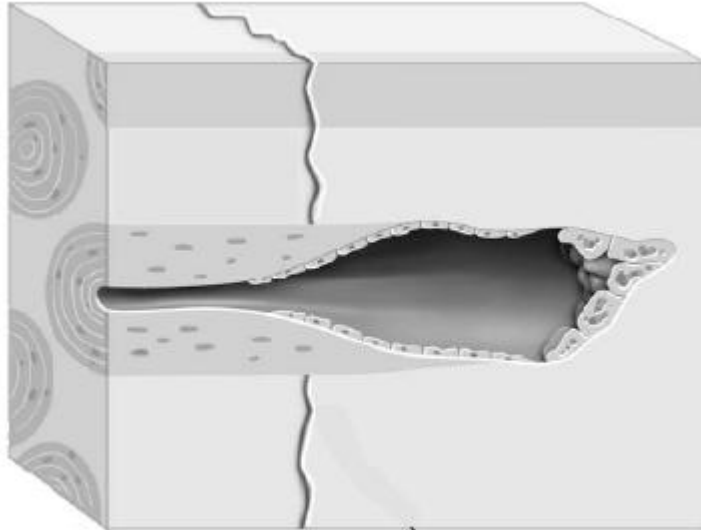


Figure 5 : *Consolidation par passage direct des ostéons*

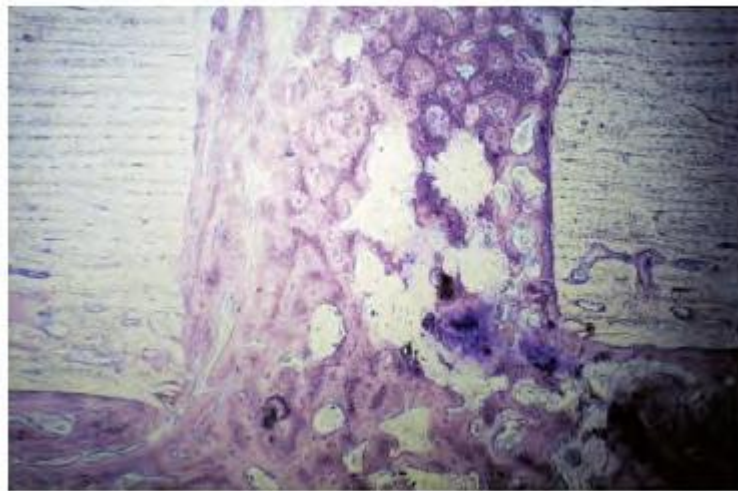


Photo 2 : *Comblement de la fente fracturaire par de l'os immature*

Avantages / inconvénients de l'ostéosynthèse par plaque vissée

L'ostéosynthèse par plaque vissée permet en théorie une réduction anatomique parfaite des foyers de fracture. Les montages sont en règle générale stables et autorisent une rééducation précoce.

Les inconvénients de l'abord direct du foyer sont l'augmentation des risques infectieux. Cette technique n'autorise pas la mise en charge de la fracture car le délai de consolidation est prolongé du fait de l'ouverture du foyer et de la dévascularisation.

Ce montage correspond à une fixation dite *statique*, c'est-à-dire que la raideur du montage est fixée une fois pour toute.

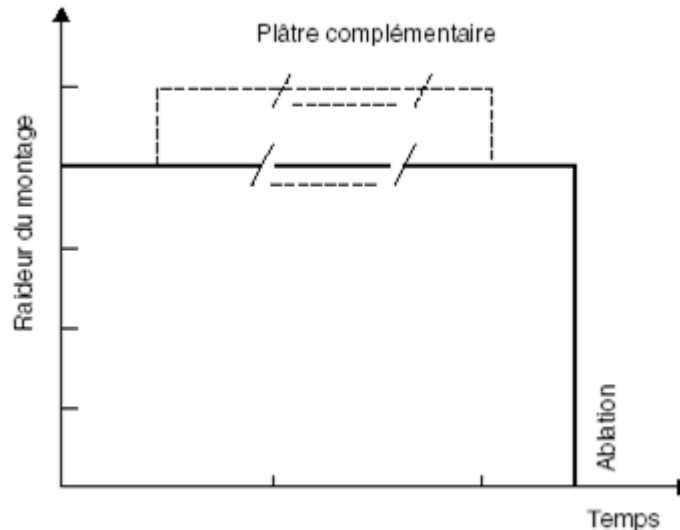


Figure 6 : l'ostéosynthèse par plaque est statique. sa raideur ne varie pas pendant toute la durée de la consolidation.

1.2.2 Ostéosynthèse par enclouage centromédullaire à foyer fermé

Au cours de cette ostéosynthèse, l'hématome fracturaire est en grande partie conservé. La portion médullaire est expulsée par l'alésage. Le cal périosté se forme sans contrainte supplémentaires, dans les délais habituels, il est généralement de gros volume.

Avantages / inconvénients

L'enclouage centromédullaire à foyer fermé limite le risque de dévascularisation et le risque infectieux. Le matériel est situé dans l'axe mécanique du segment fracturé et permet habituellement des montages solides autorisant une mise en charge précoce.

Les inconvénients sont les difficultés d'obtenir le rétablissement de l'axe longitudinal en cas de fracture métaphysaire et le contrôle rotatoire des fragments.

En dehors des fractures comminutives, l'enclouage permet une *fixation dynamique*, c'est-à dire que la raideur du montage va varier dans le temps. Dynamiser l'enclouage signifie que le verrouillage du clou peut être reporté à la sixième semaine afin de stimuler la formation du cal périosté. Le déverrouillage tardif est possible afin de renforcer un cal déjà existant ;

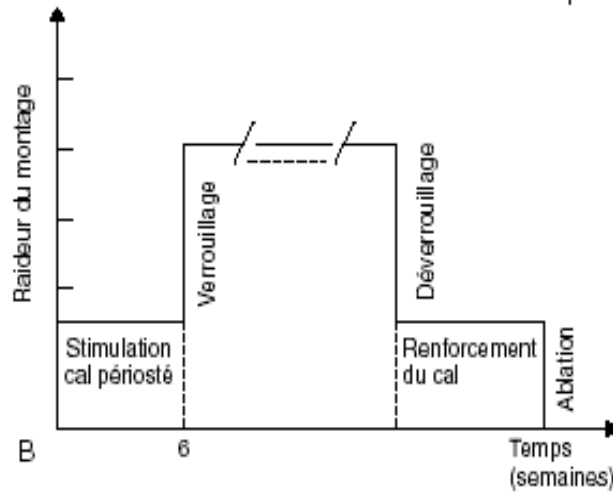


Figure 7 : le nouveau concept propose un enclouage initial non verrouillé pour stimuler le cal périosté par une légère instabilité, suivi d'un verrouillage vers la sixième semaine pour stabiliser le foyer, et éventuellement d'un déverrouillage tardif pour renforcer le cal. Ce concept ne peut s'appliquer que si le rétablissement de la longueur n'impose pas un verrouillage immédiat

1.2.3 Ostéosynthèse par fixateur externe

Les indications de la fixation externe concernent principalement les fractures ouvertes. Les fixateurs modulaires (Hoffman, Othofix, Ilizaroff) permettent de corriger secondairement les imperfections de réduction initiale. Les avantages sont de diminuer les risques infectieux en particulier en cas de fracture ouverte contaminée.

Les inconvénients sont la difficulté d'obtenir une réduction anatomique de la fracture, les risques d'infections sur les fiches, le retard de consolidation. Cependant le contexte dans lequel est employée cette fixation est à fort risque de défaut de consolidation.

L'intérêt est de protéger le foyer des contraintes extérieures dans un montage simple. Au cours des fractures comminutives l'ensemble des contraintes passe par le fixateur. De même que pour l'enclouage centromédullaire, la fixation externe peut devenir dynamique.

1.3 Processus de réparation de l'os chez l'enfant

La consolidation est plus rapide si l'enfant est plus jeune. Le siège épiphysaire raccourcit d'autant ce délai. En effet, une fracture de

l'épiphyse mettra 21 jours à consolider alors qu'une fracture diaphysaire de membre inférieur prendra entre 45 et 90 jours pour consolider.

Les étapes de consolidation sont enchondrales : hématome, élaboration des travées de collagène, cartilage puis minéralisation.

Le remodelage est très actif. La réduction des fractures touchant le cartilage de croissance doit toujours être correcte sous peine d'entraîner un cal vicieux.

1.4 Facteurs influençant la consolidation des fractures

1.4.1 Facteurs mécaniques :

L'immobilisation stricte dans le cadre d'un traitement orthopédique n'est pas indispensable : l'existence d'une mobilité permettant des contraintes en compression est favorable à la consolidation. En revanche, les contraintes en torsion ou en cisaillement sont néfastes.

1.4.2 Localisation de la fracture :

Les fractures épiphysaires et métaphysaires consolident plus rapidement que les fractures diaphysaires.

1.4.3 L'importance du déplacement

Des fragments influencent les dégâts vasculaires et l'écart inter fragmentaire. L'ouverture du foyer entraînant la disparition de l'hématome et une dévascularisation des extrémités, augmentent le risque infectieux et de non consolidation.

1.4.4 Facteurs circulatoires :

L'anémie et/ou l'hypovolémie entraînent un retard de consolidation par modification des qualités du cal.

1.4.5 Facteurs hormonaux :

Les corticoïdes retardent la consolidation en inhibant la différenciation des cellules précurseurs en ostéoblastes.

1.4.6 Facteurs nutritionnels :

L'alimentation normale apporte assez de calcium, vitamine D.

1.4.7 Facteurs bioélectriques

Ils jouent sans doute un rôle. Les expériences de stimulation électrique de fractures fraîches par Brighton, par champ électromagnétique pulsé, ont toutes montré un effet positif, dépendant

d'ailleurs du mode d'administration des courants, de la fréquence, de l'intensité, de la forme du signal ; Par ailleurs un foyer de fracture soumis à un champ électromagnétique voit augmenter sa sécrétion d'IGF II, de TGF α et BMP. Ce procédé est utilisé par certains pour les pseudarthroses et les ostéotomies.

1.4.8 Facteurs circadiens

On a montré que la qualité de la consolidation dépendait de la place de la fracture dans le nyctémère ; Il semble que cela soit sous la dépendance du taux de GH circulante lors de la fracture.

2. Les Échecs de la consolidation : les Pseudarthroses

2.1. Définition et fréquence des retards de consolidation et pseudarthroses

Malgré l'amélioration de la compréhension des différents mécanismes de la consolidation et des techniques chirurgicales, les retards de consolidation et les pseudarthroses sont toujours extrêmement fréquents dans la pratique courante en traumatologie.

Le retard de consolidation est défini comme un échec de la consolidation de la fracture dans les temps habituels, dépendant du type et du site fracturaire ainsi que des lésions des tissus mous et de l'os (101).

A l'examen clinique, on note généralement une sensibilité ainsi qu'une légère mobilité du foyer de fracture. L'examen radiographique met en évidence une formation de cal osseux en quantité variable mais toujours une radio transparence au niveau du trait de fracture.

La pseudarthrose est définie comme une absence de consolidation après un délai de deux fois le temps de consolidation habituel, soit six mois après le traumatisme au niveau des diaphyses des os longs ce processus est définitif et ne peut aboutir à la consolidation sans nouveau traitement. L'espace fracturaire est comblé par un tissu fibreux ou fibro cartilagineux au lieu du tissu osseux. Les signes cliniques habituels sont souvent une sensibilité, même si celle-ci peut être absente, ainsi qu'une mobilité du foyer.

Les signes radiologiques incluent : une persistance du trait de fracture, une sclérose des extrémités osseuses, un cal osseux hypertrophique ou au contraire une résorption osseuse atrophique et parfois une radio transparence jouxtant le matériel d'ostéosynthèse.

Seule une petite partie des fractures évolue vers la pseudarthrose, elle est estimée entre 2% et 7%. Heppenstall *et al* (52) décrivent aux Etats-Unis 2 millions de fractures des os longs, dont 100000 ont une évolution vers la pseudarthrose, et encore beaucoup plus présentent un retard de consolidation.

En France, pour le tibia, les données estiment à 2000 par an les interventions pour pseudarthrose.

Au Maroc, on regrette l'absence de statistiques et d'études suffisantes concernant ce sujet.

En 1965, Boyd *et al* (10) observaient une répartition homogène des pseudarthroses entre les différents segments de membres : tibia, fémur, humérus et avant-bras. Alors qu'actuellement, les séries donnent une nette prédominance de la localisation tibiale : 62% pour Conolly *et al* (21), 43% pour Weitzel *et al.* (129), suivie du fémur. Même si l'humérus est un os à risque de pseudarthrose, la traumatologie routière des dernières

Frost [40] propose de les classer en échecs techniques et échecs biologiques, les deux pouvant coexister :

- Les **échecs techniques**, dans lesquels le processus biologique, au potentiel intact, est entravé par infection, mobilité du foyer, dévascularisation. Ces facteurs sont retrouvés dans 3/4 des problèmes de consolidation.
- Les **échecs biologiques** seraient quant à eux responsables d'un 1/5e des problèmes de consolidation. Il peut s'agir soit de causes générant logiquement un ralentissement des divisions cellulaires comme l'irradiation locale ou la prescription d'antimitotiques, soit de causes générales altérant l'ensemble des ressources disponibles pour la reconstruction comme la dénutrition, des tumeurs métastatiques, l'hyperparathyroïdie.

Des ostéomalacies peuvent entraîner des troubles de la calcification, les dénervations locales semblent avoir des effets sur la prolifération cellulaire. Une infection locale va modifier la population cellulaire migrant vers le foyer, poussant l'organisme à rendre cette zone impropre à la survie bactérienne.

Cliniquement cette séparation est importante, ces deux groupes étiopathogéniques vont entraîner des **présentations différentes** :

- la **pseudarthrose hypertrophique** est caractérisée par des extrémités osseuses élargies (en patte d'éléphant) ou en sabot de cheval, bien vascularisées, elle est le plus souvent serrée. Conséquence d'un défaut mécanique du traitement initial, elle requiert un geste de stabilisation.
- la **pseudarthrose atrophique** est caractérisée par des extrémités osseuses rétrécies, mal vascularisées avec une ostéoporose voire une sclérose des fragments. Elle est la conséquence d'un défaut biologique et requiert une relance des processus de consolidation en plus d'un geste de stabilisation.
- La **mauvaise vascularisation** peut être primitive ou secondaire à l'absence de colonisation des fragments osseux par des cellules susceptibles de stimuler la néoangiogenèse.

2.3. Histologie

Les études histologiques concernant les pseudarthroses sont relativement rares. En microscopie optique, les retards de consolidation montrent la formation d'un cal et une fibrose inter fragmentaire ou un

tissu fibro cartilagineux, qui lentement progresse vers la consolidation osseuse (129).

Andrew observe une population histologique inactive et avasculaire, avec un bouchon scléreux obstruant le canal médullaire, aussi bien dans les pseudarthroses hypertrophiques ou atrophiques. Il en conclut qu'il n'y a pas de différence dans l'apparence histologique des tissus au niveau de l'espace inter fragmentaire.

Les pseudarthroses atrophiques, en microscopie optique, montrent des paquets désorganisés de tissus fibreux, de fibres de collagène, et de nombreux fibroblastes dans l'espace inter fragmentaire. De plus des îlots de fibrocartilage peuvent être observés (129). En microscopie électronique, les fibroblastes présentent beaucoup de mitochondries et de réticulum endoplasmique ; la matrice extracellulaire est riche en fibres de collagène orientées dans toutes les directions. Au niveau des îlots fibrocartilagineux, les chondroblastes sont entourés par une matrice riche en collagène où se trouvent de nombreuses vésicules denses non minéralisées.

Dans les pseudarthroses hypertrophiques, on note un tissu fibro cartilagineux avec une matrice minéralisée (ossification enchondrale), en microscopie optique. Un tissu trabéculaire ostéoïde est fréquemment observé. Les capillaires dans le tissu fibro-cartilagineux sont vides ou fermés. En microscopie électronique, les chondroblastes dans les zones minéralisées présentent un cytoplasme abondant avec beaucoup de mitochondries et de réticulum endoplasmique. Dans la matrice, on peut observer de nombreuses vésicules denses contenant des cristaux d'hydroxyapatite (84).

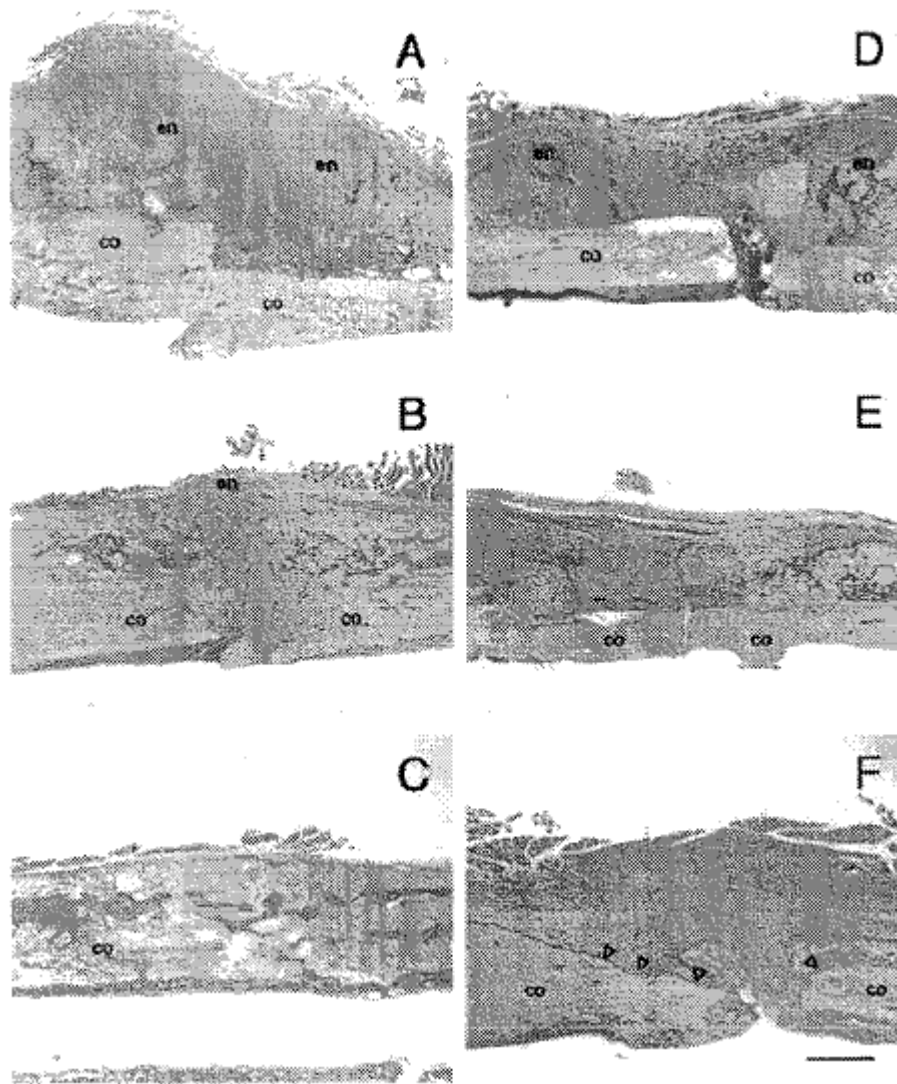


Figure 9: Modèle expérimental de pseudarthrose (D-F) et de consolidation (A-C) chez le rat

- A et D : présence d'une ossification enchondrale avec un espace inter fragmentaire plus important en à 2 semaines ;
 B : consolidation à 4 semaines,
 C : remodelage à 8 semaines ;
 E : absence de consolidation ;
 F : pseudarthrose et résorption osseuse.

Dans les pseudarthroses septiques, l'examen montre une infiltration cellulaire inflammatoire aiguë avec une résorption trabéculaire due à la nécrose. L'œdème local, l'activité leucocytaire, et le changement du pH participent à cette nécrose osseuse

2.4. Physiopathologie : facteurs influençant les pseudarthroses

Les facteurs biologiques, ont une part importante dans la consolidation des fractures. Ces facteurs couvrent de la prolifération et la différenciation cellulaires jusqu'à la néoangiogenèse, et incluent des facteurs biochimiques, qui vont apparaître, disparaître, ou être modifiés durant tout le processus de consolidation.

Les facteurs mécaniques, une fracture ne peut consolider si les conditions mécaniques ne sont pas appropriées. Parmi les données de la littérature, on peut retrouver de nombreux facteurs de risque d'évolution vers une pseudarthrose. La difficulté est d'isoler les facteurs indépendants, de ceux non indépendants.

Audigé *et al* (1) ont publié en 2005 une analyse multicentrique étudiant les facteurs de risque de retard de consolidation et de pseudarthrose à propos de 416 fractures de tibia opérés. Le taux de retard de consolidation et de pseudarthrose était de 12,5%, celui de pseudarthrose était de 5%, un tiers atrophique, deux tiers hypertrophiques.

D'autre part, Bhandari *et al* (5) ont étudié les facteurs de risque de réintervention après fractures opérées du tibia, à propos de 200 cas. Ces deux études se corroborent parfaitement entre elles et avec d'autres (32, 63) et retenons particulièrement les facteurs indépendants sortant en analyse multivariée, en effet les facteurs comme le degré de communiton ou le mode d'ostéosynthèse utilisé sont à mettre en relation avec le traumatisme à haute énergie et l'ouverture cutanée.

Les facteurs statistiquement significatifs retenus en analyse multivariée de ces études sont présentés en gras :

2.4.1 Liés au patient :

- Tabagisme (81)
- Utilisation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens après la fracture (> 4 semaines) (119)
- Prise d'antibiotiques (5)
- Diabète (24)
- Alcool (36)
- Obésité (36)

2.4.2 Liés à la fracture :

- Communiton fracturaire (32,41)
- **Traumatisme à haute énergie**, polytraumatisme (5)

- Type de fracture (1)
- **Trait de fracture transversal** (5)
- **Ouverture Cutané** (5), Risque Relatif (RR) : si <5cm RR=6,9, si>5cm RR=13,9 (3) (annexe 1)
- **Atteinte des tissus mous** (1)
- **Localisation distale de la fracture sur la diaphyse tibiale** (1)

2.4.3 Liés à la technique :

- Réduction à foyer ouvert (63) : perte de l'hématome fracturaire
- Fautes techniques : vis dans le foyer (16), enclouage dynamique sur fracture instable (32), ostéosynthèse instable (24), ostéotomie fibulaire en regard du foyer tibial (16), déperiostage peropératoire(24)
- Fracture de fibula associée non traitée (1)
- Type d'ostéosynthèse : fixateur externe par rapport au clou (1), clou non-alésé par rapport à une plaque (5)
- **Diastasis postopératoire** (5)

3 Moelle osseuse, cellules souches et facteurs de croissance

3.1 Cellules souches

3.1.1 Définition

- **Cellules souches** : c'est une cellule jeune qui n'exprime aucune propriété, on la dit indifférenciée. Lorsque ces cellules sont placées dans un environnement tissulaire approprié, elles sont capables de se multiplier et de produire des cellules matures, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifique du tissu : c'est la différenciation.

- **Totipotente** : c'est une cellule qui a le pouvoir de donner la naissance aux trois feuillets embryonnaires, aux cellules germinales et aux tissus placentaires. Elle a la capacité de donner un individu complet.
- **Pluripotente** : c'est une cellule qui a le pouvoir de donner naissance aux trois feuillets embryonnaires et aux cellules germinales. Elle ne peut pas donner un individu complet.
- **Multipotente** : c'est une cellule qui a le pouvoir de générer plusieurs types de cellules dans un tissu donné. Elle est spécifique d'un type de tissu. Exemple : cellules souches hématopoïétiques, neurales...
- **Unipotente** : ce sont les précurseurs. Ils ont le pouvoir de générer un type de cellule. Ils sont spécifiques d'un type de cellule. Exemple : myéloblaste, érythroblaste.



Figure 9 : Blastocyste Presse Med 2002; 31: 871

3.1.2 Origine

* **Les cellules souches embryonnaires** : sont issues des premières divisions embryonnaires, au stade blastula (4 à 5j). Elles sont totipotentes. Elles présentent plusieurs inconvénients. Leur culture peut entraîner des mutations génétiques avec risque de tumeur secondaire. D'autre part elles sont immunocompétentes, pouvant entraîner un rejet de l'hôte. Enfin leur utilisation, se heurte à des problèmes éthiques non résolus actuellement.

* **Les cellules souches fœtales** sont issues des tissus fœtaux à un stade plus tardif (5-9 semaines) et sont isolées à partir de fœtus issus d'avortements.

* **Les cellules souches adultes** sont déjà dans un programme tissulaire spécifique (multipotence). Plusieurs sous-types sont identifiés: cellules souches hématopoïétiques, neuronales, mésenchymateuse, épithéliale, gastro-intestinales et épidermiques. Les cellules souches adultes et plus particulièrement les cellules souches mésenchymateuses sont les plus utilisées et les plus immunocompatibles

3.1.3 Localisation des cellules mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans divers tissus de l'organisme (127) :

* **La moelle osseuse** est la source la plus riche et la plus accessible en cellules souches mésenchymateuses. Elle contient différents types de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques qui donnent naissance aux différentes lignées sanguines, les cellules souches mésenchymateuses qui assurent la fonction de soutien stromal, ainsi que des MAPC « multipotent adult progenitor cells » qui sont des cellules souches pluripotentes, existant dans différents tissus adultes, équivalentes aux cellules souches embryonnaires et qui seraient l'ancêtre des toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse (30).

* **Les tissus fœtaux** comme le placenta et le cordon ombilical sont également riches en cellules souches mésenchymateuses.

***Les tissus conjonctifs de l'adulte** peuvent contenir un faible pourcentage de cellules souches mésenchymateuses, en particulier le tissu adipeux, le périoste, la membrane synoviale, les muscles ainsi que les tendons.

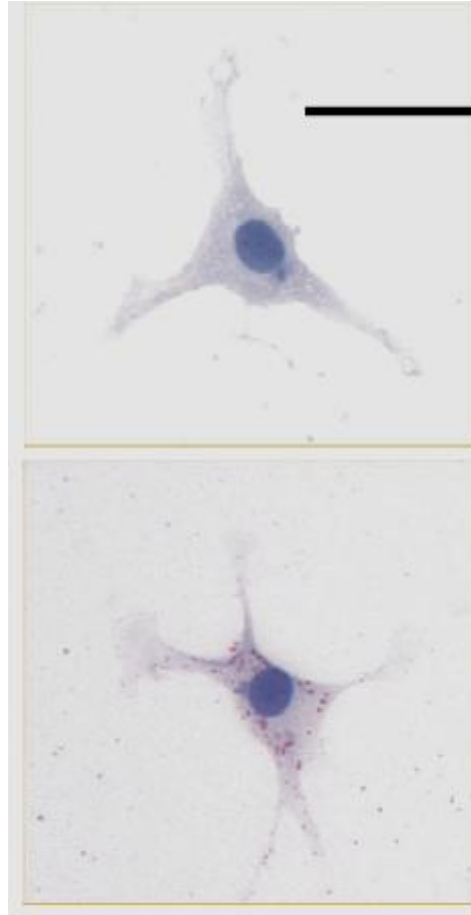


Figure11: Characteristic morphology of sorted BM MSCs with long projections, which is reminiscent of BM adventitial reticular cells (ARCs)

Rheumatology 2008;47;126–131
Advance Access publication 6 November 2007

3.1.4 Les cellules du stroma de la moelle osseuse

Il est possible d'obtenir in vitro une population cellulaire adhérente au support de morphologie fibroblastique à partir de moelle osseuse. A faible densité, cette population apparaît sous forme de clones de tailles variées dont une proportion est ostéogène. Les cellules à l'origine de ces clones ont été initialement appelées Colony-Forming-Unit- Fibroblasts ou

CFU-F. Elles ont reçu par la suite l'appellation de cellules souches du mésenchyme. Leur descendance est généralement appelée cellules du stroma de la moelle osseuse. En plus du phénotype ostéoblastique, les cellules du stroma de la moelle osseuse ont la capacité de se différencier vers d'autres types cellulaires. Elles peuvent, sous des conditions de culture ou d'implantation appropriées, donner naissance à des types cellulaires différenciés du cartilage, du tissu adipeux, du muscle, du coeur, du foie et du cerveau. Leur potentiel ostéogène a été mis en évidence dès 1968 : implantées *in vivo* elles sont capables de donner naissance à un tissu osseux néoformé. Lorsque les cellules du stroma de la moelle osseuse sont cultivées avec des agents inducteurs appropriés (acide ascorbique, bêta glycérophosphate, dexaméthasone ...) elles peuvent acquérir *in vitro* un phénotype ostéoblastique. Cette différenciation cellulaire se traduit par l'augmentation de l'activité phosphatase alcaline et par la production d'une matrice minéralisée. *In vivo*, ces cellules peuvent initier une formation osseuse en site intramusculaire, sous-cutané ou osseux (4). Le potentiel ostéogène de ces cellules est fonction du nombre de cellules du stroma de la moelle osseuse implantées. Les cellules du stroma de la moelle osseuse existent dans des proportions très faibles (0,0001% à 0,01 % des cellules nucléées) dans la moelle osseuse (104). Les cellules du stroma de la moelle osseuse ont un pouvoir d'autorenouvellement important, mais limité, elles entrent en sénescence après 30-40 doublements.

3.1.5 Evolution cellulaire au cours de l'induction ostéogénique

Quel chemin suit l'induction ostéogénique qui permet aux cellules précurseurs de donner naissance aux ostéoblastes ?

Trois théories existent. Elles sont rappelées dans l'article de Hernigou *et al* (50) :

- Théorie déterministe : au cours de la différenciation cellulaire et de son vieillissement, une cellule souche va parcourir les différents stades donnant naissance successivement à des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales, des chondroblastes et enfin des ostéoblastes. L'absence de passage par le stade cartilagineux après ostéosynthèse stable n'est pas en faveur de cette théorie ;

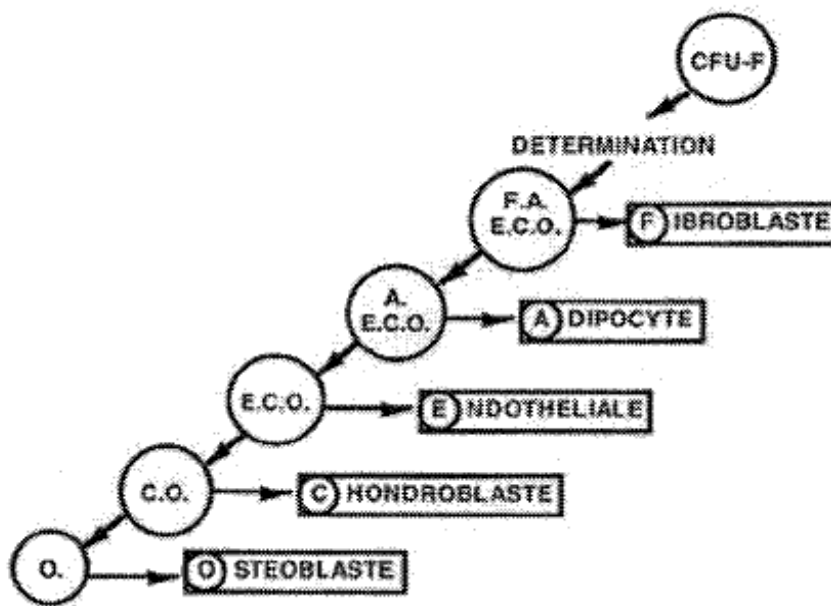


Figure 12: Théorie déterministe(50)

- Théorie instructive : les cellules souches auraient des récepteurs aux différents facteurs de croissance. La différenciation se ferait irréversiblement en fonction du facteur de croissance intervenant. Cette théorie est en accord avec les études expérimentales ;

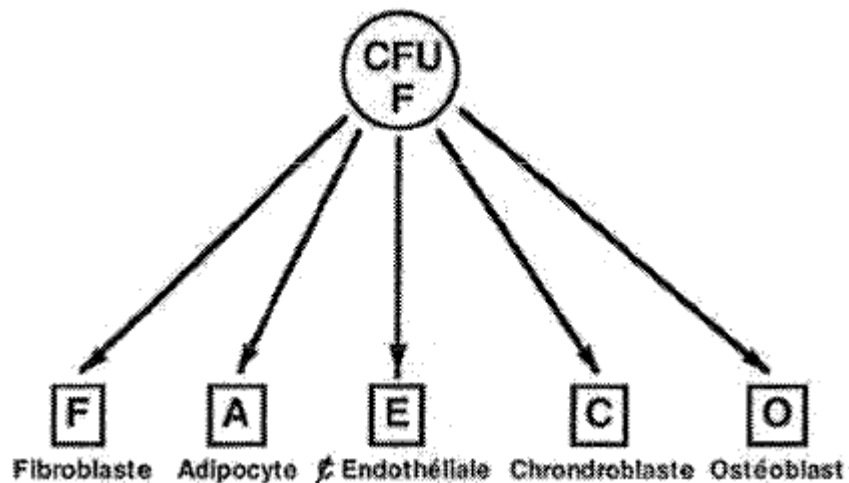


Figure 13: Théorie instructive(50)

- Théorie stochastique : la différenciation serait aléatoire. Les facteurs de croissance seraient purement permissifs, permettant ou non la survie des cellules (figure)

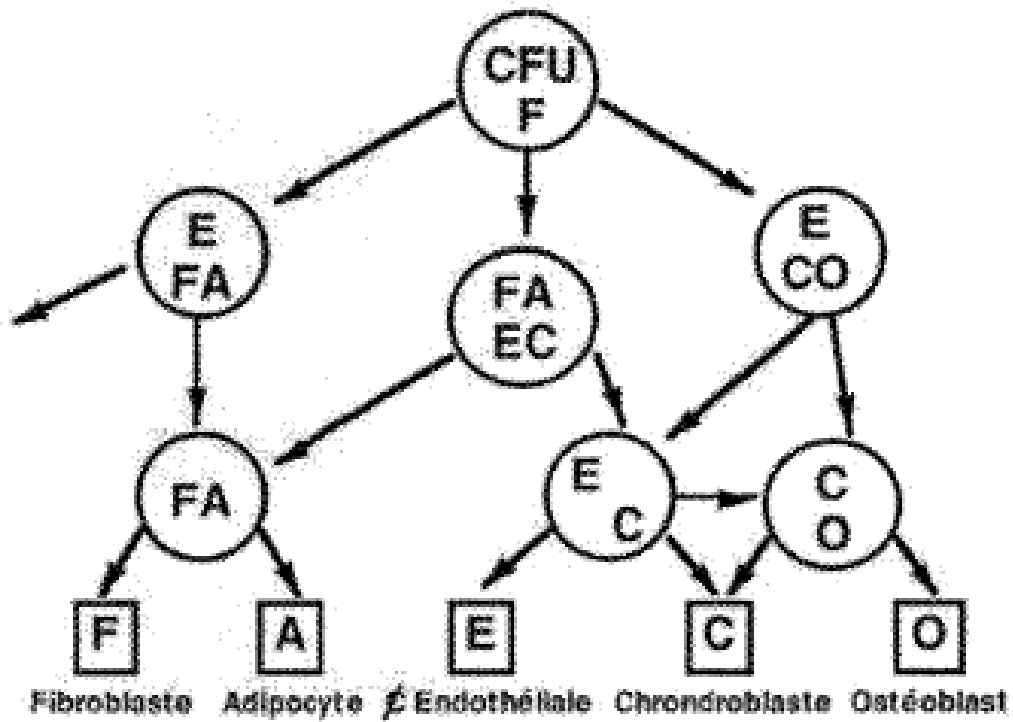


Figure 14: Théorie stochastique (50)

3.1.6 Expansion cellulaire des cellules souches ou non

- *Cellules souches sans expansion cellulaire*

- **Avantages**

L'avantage principal de l'utilisation des cellules souches sans expansion cellulaire est la simplicité de la procédure ; les cellules extraites de la moelle osseuse peuvent directement être mises en place au niveau du site osseux. C'est la procédure la plus utilisée non seulement en raison de son faible coût mais aussi car elle ne nécessite qu'une instrumentation très réduite peut être réalisée au cours d'une procédure mini invasive. Même si les cellules souches stromales sont concentrées, ce qui requiert des moyens supplémentaires, cette procédure reste très avantageuse car elle permet une réinjection dans un laps de temps court. Actuellement, il n'y a pas encore de preuves évidentes de la supériorité d'un type cellulaire par rapport à un autre dans la consolidation osseuse.

Dans les techniques sans expansion, plus d'un type cellulaire et plus d'un type de cellules souches sont introduits au niveau du foyer osseux à traiter. Ainsi les chances que le bon type cellulaire soit présent et que ces différents types cellulaires aient un effet synergique, est un argument contre leur sélection. De plus, le fait que ces cellules proviennent directement de la moelle osseuse, diminue le risque de perte de cellules souches dans la fraction extraite.

- **Désavantages**

La moelle osseuse est une bonne source de cellules souches stromales, mais elle n'est pas illimitée. Les cellules souches du stroma dans la moelle osseuse sont rares. On estime qu'il y a 32 millions de cellules nucléées par ml, et seulement une cellule souche stromale pour 18000 cellules nucléées (78, 85). Comme l'on aspire 2 à 4 ml de moelle osseuse, on peut déduire que l'on n'obtient que quelques centaines de cellules souches stromales à chaque aspiration. Augmenter la quantité de moelle osseuse aspirée n'est pas une solution, car il a été prouvé qu'augmenter la quantité de moelle osseuse aspirée à chaque aspiration n'augmente pas significativement le nombre de cellules souches ; suggérant qu'au-delà d'une certaine quantité, c'est du sang et non de la moelle osseuse qui est

aspiré (84). De ce fait, le nombre de cellules souches qui peuvent être implantées sans expansion est assez limité.

Il est aussi difficile de prouver que l'effet direct de la moelle osseuse est en relation avec les cellules souches stromales. D'abord parce que la moelle osseuse ne contient pas que les cellules souches stromales mais aussi les cellules souches hématopoïétiques, des cellules erythroïdes, des cellules myéloïdes. D'autre part, ce qui est injecté comporte aussi d'autres cellules, du sang, du plasma, des facteurs de croissance, des plaquettes, de la graisse. Enfin on ne dispose pas d'anticorps spécifiques de cellules souches stromales qui permettent de séparer ces cellules souches du reste de la moelle osseuse.

- ***Expansion cellulaire ex vivo***

• **Avantages**

Du fait du faible nombre de cellules souches stromales dans la moelle osseuse, des investigateurs ont senti la nécessité d'augmenter ce nombre de cellules par des techniques d'expansion *ex vivo*. Après aspiration, les cellules nucléées sont placées dans des milieux de cultures ou des bioréacteurs. Heureusement les cellules souches prolifèrent facilement et tendent rapidement à excéder les autres types cellulaires inclus dans la fraction nucléée de la moelle osseuse, limitant ainsi la contamination par les autres types cellulaires. Dépendant de la méthode de culture, un nombre important de cellules peut ainsi être extrait en quelques jours ou semaines. Un autre avantage de l'expansion cellulaire est que, si nécessaire, ces cellules souches peuvent être modifiées par génie génétique pour exprimer une protéine, comme une de la famille des BMP, afin d'accroître leur potentiel ostéogénique.

Les cellules souches pour expansion cellulaire peuvent provenir de différentes sources comme d'une aspiration de graisse abdominale. Même si leur nombre est moins important au départ, cela sera compensé par les cultures d'expansion cellulaire. Un autre avantage de ces expansions cellulaires est que, si on le désire, ces cellules peuvent être orientées avant implantation vers différentes lignées mésenchymateuses comme le cartilage ou l'os.

- **Désavantages**

La méthode pour isoler et multiplier ces cellules souches n'est pas identique partout. Il en existe principalement deux. La première utilisée par Friedenstein *et al* (37) sélectionne les cellules par leur capacité à adhérer à des supports, et la seconde sélectionne les cellules en utilisant un anticorps par enrichissement ou déplétion cellulaire. Ces méthodes ne sélectionnent pas forcément des cellules identiques. Par contre les cellules issues de ces deux méthodes sont capables de se différencier en cellules de la lignée ostéogénique.

Les désavantages de ces techniques d'expansion cellulaire sont nombreux. D'une part, elles présentent un coût important. La culture en elle-même est coûteuse, parce que les facteurs de croissance et le sérum nécessaires à l'expansion doivent être d'origine humaine et recombinant. De plus la réglementation de ces expansions cellulaires est très contraignante.

Un autre désavantage de cette expansion est la durée requise entre l'aspiration et la réimplantation cellulaire. Même si celle-ci a été réduite, de plusieurs jours à plusieurs semaines, elle oblige le patient à subir différentes interventions.

- **Limites et difficultés**

Le problème actuel est que l'on ne connaît pas le nombre minimal de cellules requises pour provoquer la consolidation, ce qui est une clé de la nécessité de culture des cellules souches ou non. Le second problème est qu'il n'y a pas de données claires pour savoir si le potentiel ostéogénique des cellules souches stromales est meilleur que celui de précurseurs plus différenciés, et donc à quel stade de différenciation doivent être implantées les cellules. Enfin l'évolution des cellules implantées est encore une question, on ne sait combien de cellules une fois implantées vont survivre et vers quelles lignées cellulaires elles vont se différencier (74).

3.1.7 Cellules souches de la moelle osseuse et ostéogénèse

Actuellement il existe un engouement important pour la capacité des cellules de la moelle osseuse à servir de support pour le renouvellement de nombreux tissus. De nombreuses études indiquent que les cellules souches de la moelle osseuse possèdent un potentiel ostéogénique.

Il est incertain si plusieurs lignées ont un potentiel ostéogénique ou bien s'il existe une cellule souche primitive qui donne naissance à celles-ci et à d'autres types cellulaires. La plupart des études ont obtenu une ostéopoïèse lors de la culture des cellules souches stromales avec des cytokines favorisant la différenciation osseuse. Les cellules souches stromales sont une population hétérogène de cellules ; néanmoins une seule cellule souche stromale peut, de manière clonale, donner naissance à deux ou trois lignées mésenchymateuses dont la lignée osseuse (94). Les études ont montré la capacité ostéogénique des cellules de la moelle osseuse, en particulier les CFU-F aussi bien chez la souris que chez l'homme.

- Cellules souches mésenchymateuses

Comme nous l'avons vu, elles sont capables d'auto renouvellement et elles peuvent, de manière clonale, donner naissance à différentes lignées cellulaires : os, cartilage, muscle, tissu adipeux. La nature clonale de ces cellules souches mésenchymateuses a été prouvée alors qu'elle était suspectée depuis longtemps. Ainsi l'isolement d'une cellule souche mésenchymateuse génère des clones qui expriment les mêmes caractéristiques phénotypiques de surface que la cellule mère. De manière intéressante sur six clones de cellules mésenchymateuses étudiées, seuls deux présentaient un potentiel ostéogénique, chondrogénique et adipocytaire ; les autres étant bipotents (ostéogénique et chondrogénique, ostéogénique et adipocytaire), ou unipotents (chondrocytaire) (70). Cela suggère que par nature les cellules souches mésenchymateuses sont hétérogènes. Néanmoins ces cellules souches mésenchymateuses peuvent provoquer *in vitro* une matrice minéralisée et *in vivo* une formation

osseuse.

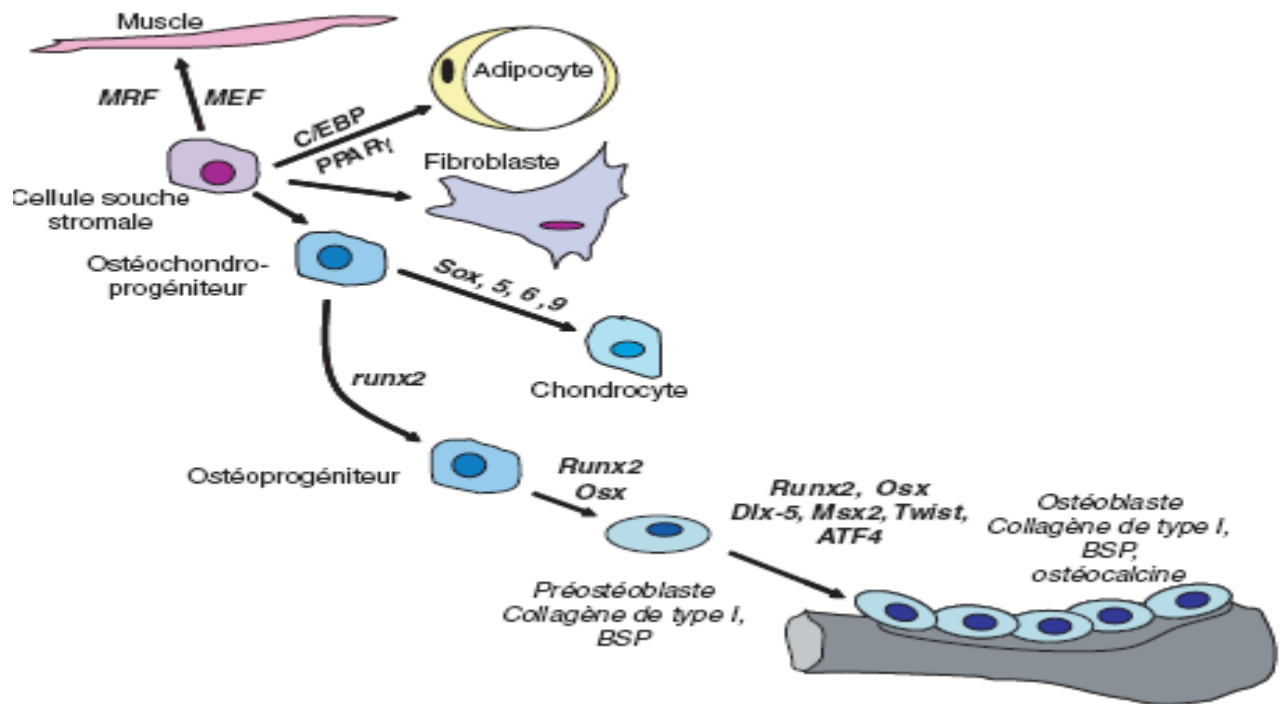


Figure 15. Différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique. Les ostéoblastes se différencient à partir d'un précurseur mésenchymateux, situé dans la moelle osseuse ou à la périphérie des vaisseaux ou circulant, qui peut aussi se différencier en cellule musculaire squelettique, adipocyte, chondrocyte ou fibroblaste par le jeu de l'expression de différents facteurs de transcription (en italique). Osterix (Osx) agit en aval de runx2 qui induit un phénotype ostéoblastique (expression des marqueurs tels que le collagène de type I et la BSP pour les préostéoblastes, et l'ostéocalcine pour les ostéoblastes matures).

MRF : *myogenic regulatory factors* ; MEF2 : *myocyte-enhancer factor 2* ; C/EBP : *CCAAT-enhancer-binding protein* ; PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* ; Runx2 : *runt-related transcription factor 2* ; BSP : *bone sialoproteine*.

Thomas T., Martin A., Lafage-Proust M.-H. Physiologie du tissu osseux. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris),

Appareil locomoteur, 14-002-B-10, 2008.

- **Cellules ostéoprogénitrices**

Elles sont fonctionnellement définies par la capacité de générer de manière clonale des cellules d'une ou plusieurs lignées mais avec une perte de capacité d'auto renouvellement. Ce qui s'exprime *in vitro* par le fait que les cellules ostéoprogénitrices donnent naissance à des colonies de cellules, avec une relation linéaire entre les nombres de cellules cultivées et le nombre de colonies formées passant par le point zéro. On ne sait pas si ces cellules stromales progénitrices sont bi ou tripotentes de la lignée mésenchymateuse, comme on peut le voir avec les précurseurs hématopoïétiques. Mais il apparaît que plusieurs types cellulaires de morphologie différentes coexistent pouvant donner une activité d'ostéogénèse mais avec des mécanismes de régulation différents (71).

Dans le contexte il est difficile de savoir s'il s'agit de cellules différentes ou si interviennent les phénomènes de plasticité cellulaire. Les études menées par Friedenstein et *al* et Owen et *al* (37, 93- 95) ont rapporté la capacité ostéogénique, *in vitro* et *in vivo*, des cellules souches stromales issues de la moelle osseuse chez les rongeurs. Ces cellules sont caractérisées par une sous-population de cellules adhérentes, qui forment des colonies de cellules fibroblast-like, appelées CFU-F. En culture, ces CFU-F génèrent une population hétérogène de progéniteurs, dont certains ont un potentiel ostéogénique (94). Cependant, seulement une partie de ceux-ci ont une activité phosphatase alcaline positive, et parmi ceux ayant une activité phosphatase alcaline positive, seule une partie possède une activité ostéogénique. Ces cellules quand elles sont cultivées dans un milieu de culture minéralisé ont la capacité de former des nodules osseux.

L'avantage de ces cultures est de contenir les différents types de progéniteurs nécessaires à la formation osseuse (précurseurs ostéogéniques et non ostéogéniques).ces études ont aussi montré la présence de différents types de cellules ostéoprogénitrices comme l'indiquent les caractéristiques des colonies et leurs sensibilités différentes à la dexaméthasone (71). De plus elles ont mis en évidence que la culture des CFU-F ou des CFU-ostéoblaste ne montre pas de prolifération clonale jusqu'à des densités importantes mais que l'ajout de cellules non adhérentes restaure le caractère clonal de la prolifération, ce qui prouve la nécessité de cellules accessoires dans le développement de ces cellules ostéoprogénitrices.

Les études chez l'homme ont confirmé les résultats du modèle murin. En effet, des transplantations de moelle osseuse allogénique ont été utilisées pour le traitement de l'ostéogenèse imparfaite, prouvant la présence de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse transplantée. Honvitz *et al* (56) ont mis en évidence une accélération de la courbe de croissance de patients atteints d'ostéogenèse imparfaite et une augmentation de la minéralisation osseuse après perfusion de cellules souches mésenchymateuses hétérologues.

Les récentes études *in vitro* ont montré la variabilité en nombre des ostéoprogéniteurs dans la moelle osseuse : suivant l'âge (29, 85) ou non (62, 120), le sexe (85), la consommation d'alcool (45, 85), la prise de corticoïdes (55), chez les patient présentant une ostéonécrose (48), ou une pseudarthrose (49), après un polytraumatisme (113) ; cependant, il n'a pas été retrouvé de différence en fonction tabagisme alors qu'il est pourvoyeur de pseudarthroses, de même il n'y pas de baisse des ostéoprogéniteurs dans l'ostéoporose (62, 120).

Les ostéoprogéniteurs humains ont été cultivés à partir de populations adhérentes (26) et de populations non adhérentes (71) de moelle osseuse, bien que la relation entre ces phénotypes ne soit pas connue. Les ostéoprogéniteurs montrent une hétérogénéité importante dans leur développement. Il existe des sous-populations différentes quant à leur antigénicité (71), qui montrent des réponses différentes à l'utilisation des facteurs de croissance (71). Cette population de cellules dérivées de la moelle osseuse est négative pour le marqueur hématopoïétique CD34 (71). Ce qui prouve l'existence de différentes populations cellulaires fonctionnellement différentes. Des expériences avec des ostéoprogéniteurs hautement purifiés ont montré qu'en l'absence de cellules accessoires (osteopoietic accessory cells), cellules non adhérentes, sans marqueur antigénique osseux, les précurseurs ostéoblastiques mourraient même en présence de multiples cytokines activateurs osseux. Ces cellules accessoires produiraient un régulateur soluble qui agirait sur la prolifération et la différenciation des ostéoprogéniteurs purifiés.

3.2 Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des protéines sécrétées par des cellules qui agissent sur des cibles cellulaires ou des cellules et qui provoquent des actions spécifiques. Trois types sont possibles : autocrine dans laquelle le facteur de croissance agit sur la cellule origine et celles de même phénotype ; paracrine qui agit sur le voisinage de cellules de phénotype différent ; endocrine qui agit sur des cellules différentes sur un site anatomique éloigné. Ainsi, un facteur de croissance peut avoir des actions sur les différentes cellules et engendrer des réponses cellulaires au niveau de tissus différents.

Facteur de croissance	Source	Récepteur	Fonction
Transforming Growth Factor-Beta (TGF-β)	Plaquettes, matrice osseuse extracellulaire, matrice cartilagineuse	Sérine thréonine Sulfate	Pléiotropique, prolifération des cellules mésenchymateuses indifférenciées
Bone Morphogenetic Proteins (BMP)	Progéniteurs osseux, ostéoblastes, matrice osseuse extracellulaire	Sérine thréonine sulfate	Différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes et ostéoblastes, des progéniteurs osseux en ostéoblastes
Fibroblast Growth Factors (FGF)	Macrophages, cellules mésenchymateuses, chondrocytes, ostéoblastes	Tyrosine kinase	Mitogène pour les cellules mésenchymateuses, chondrocytes et ostéoblastes
Insuline-Like Growth Factors (IGF)	Matrice osseuse, ostéoblastes, chondrocytes	Tyrosine kinase	Favorise la prolifération et la différenciation des progéniteurs osseux
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	Plaquettes, ostéoblastes	Tyrosine kinase	Mitogène pour les cellules mésenchymateuses, ostéoblastes, chimiotactisme des macrophages

Tableau 2: Facteurs de croissance osseux et action cellulaire(84)

3.2.1 Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)

Le TGF- β appartient à une famille de protéines appelée TGF- β superfamily. Elle comprend cinq isoformes de TGF- β (TGF- β 1 à TGF- β 5), les Bone Morphogenetic Proteins (BMP), les Growth Differentiation Factors (GDF), des activines et des inhibines. Le TGF- β influence la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire, et la synthèse de matrice extracellulaire.

Le TGF- β est trouvé dans de nombreux tissus, particulièrement au niveau de l'os, des plaquettes et du cartilage. Le TGF- β 1 est probablement relâché par les plaquettes après la formation du caillot au moment de la fracture. Sa sécrétion semble être associée à une prolifération du tissu périoste en effet il existe en immunomarquage une expression de TGF β -1 dans la période précoce de la consolidation. De plus, la plus intense activité est retrouvée dans les périodes de prolifération cellulaire cartilagineuse et d'ossification enchondrale. Aussi bien les chondrocytes que les ostéoblastes ont de nombreux récepteurs au TGF- β , suggérant l'hypothèse d'une action de ces facteurs à tous les stades de la consolidation osseuse.

Les études expérimentales ont montré une forte augmentation du volume du cal périoste avec le TGF- β 1 mais sans augmentation de la résistance mécanique, sauf en cas de concentrations très importantes. De même les études sur le TGF- β 2 ont aussi montré une augmentation du volume du cal, mais uniquement si le foyer de fracture était stable, et sans augmentation, de la densité osseuse dans ce cal enchondral.

Ainsi le TGF- β possède une activité importante au niveau de la phase précoce de la consolidation par ses capacités de prolifération cellulaire, mais son pouvoir ostéoinducteur paraît tout à fait limité.

3.2.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMP)

Les BMPs font partie de la TGF- β superfamily, et plus de vingt molécules différentes ont déjà été identifiées. Actuellement, les BMP 2, 3, 4 et 7 sont reconnues pour leur rôle dans la consolidation osseuse par leur capacité à induire la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules de la lignée ostéochondroblastique. Les BMP jouent aussi un rôle important dans la croissance cellulaire et dans la formation osseuse.

Le concept qu'une substance dans l'os puisse induire une néoformation osseuse a été introduit par Urist en 1965, quand il a observé après l'implantation de substance osseuse déminéralisée dans un muscle, la formation d'un os. C'est le phénomène d'ostéoinduction, puis a été reconnue la protéine responsable de ce phénomène, la BMP. Par la suite et encore actuellement on identifie de nombreux isoformes, synthétisables par génie génétique.

De nombreuses études expérimentales ont déjà été menées qui ont montré l'efficacité des BMP recombinantes humaines (rhBMP) sur la consolidation de larges pertes de substance osseuse et l'accélération de la consolidation osseuse chez l'animal. Elles ont montré avec la rhBMP-7 (appelée aussi Osteogenic Protein-1 ou OP1) un taux de consolidation plus important qu'avec des greffes osseuses autologues dans des délais beaucoup **plus** rapides.

L'évaluation histologique a montré l'apparition de nouvelles corticales composées d'os immature et aussi d'os lamellaire orienté avec une organisation médullaire normale. De plus les études mécaniques ont montré une restauration rapide des résistances à la fracture proche de la normale, très supérieures à celles observées avec des greffes osseuses autologues (27).

Les études avec la BMP-2 ont aussi montré leur efficacité dans la consolidation des pertes de substance osseuse sur les modèles animaux quant à l'accélération de la consolidation et de la restauration des propriétés mécaniques de l'os.

La réparation induite par les BMP se produit selon un effet dose dépendant et correspond à la fois à une réparation enchondrale et

endoconjonctive. L'ensemble des investigations révèle l'importance majeure du potentiel ostéoinducteur des BMP. « Les activités des BMP sont complémentaires et l'effet anabolique osseux *in vivo* sur le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules ostéoformatrices résultent probablement de l'effet séquentiel et combiné de diverses protéines. Les effets cellulaires des BMP sont très complexes (79).

3.2.3 Fobroblast Growth Factors (FGF)

Les FGF ont un rôle important dans l'angiogénèse, et une action mitogène sur les cellules mésenchymateuses. Les FGF les plus fréquents sont le FGF-1 et le FGF-2. Le FGF a principalement un effet mitogène sur la prolifération chondrocytaire, et est sécrété par les ostéoblastes. Le FGF-2 est produit par ces cellules à une concentration dix fois plus importante que le FGF-1, mais c'est le FGF-1 qui paraît avoir l'activité biologique la plus importante.

Les études expérimentales ont montré avec l'utilisation de FGF-2 un effet dose-dépendant sur la consolidation osseuse, le volume osseux et sur la minéralisation de l'os néoformé. De plus elles ont montré l'accélération du remodelage osseux, qui permet la restauration des propriétés mécaniques de l'os, par activation des ostéoclastes.

3.2.4 Growth Hormone (GH) et Insuline-Like Growth Factors (IGF)

GH et IGF sont des hormones particulièrement impliquées dans le développement squelettique. La GH par son action systémique aurait un intérêt pour traiter l'ostéoporose ou les problèmes de consolidation osseuse. Celle-ci est sécrétée par l'hypophyse sous la dépendance de la GH-RH, hormone hypothalamique, puis après passage systémique va activer les cellules cibles au niveau du cartilage de croissance et du foie qui vont sécréter l'IGF. Deux sous-types ont été identifiés : IGF-1 et IGF-2. Bien que l'IGF-2 soit le facteur le plus présent au niveau de l'os, l'IGF-1 semble le plus intéressant et a été mis en évidence au niveau de la consolidation des fractures.

Les études expérimentales ont mis en évidence une augmentation de la résistance mécanique des os après fracture par l'utilisation d'IGF- 1, avec un effet dose-dépendant jusqu'à un palier.

Par contre l'injection de GH n'a pas mis en évidence d'amélioration de la consolidation, alors que les taux sériques d'IGF-1 étaient augmentés.

Le rôle de l'IGF-1 sur la consolidation semble correspondre uniquement à une amélioration de la consolidation endoconjonctive et ne semble pas avoir d'effet sur la consolidation endochondrale.

3.2.5 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Le PDGF est sécrété par les plaquettes pendant les phases précoces de la consolidation et a été mis en évidence au niveau des sites de fractures aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Les études *in vitro* ont montré le pouvoir mitogène du PDGF sur les ostéoblastes. Les études *in vivo* ont montré l'augmentation de la différenciation ostéogénique aussi bien endostée que périostée avec le PDGF, mais sans que l'on retrouve d'amélioration de la consolidation au niveau mécanique.

A l'heure actuelle les effets du PDGF sur la consolidation sont encore très peu clairs.

3.2.6 Facteurs de croissance et pseudarthrose

Les facteurs de croissance jouent un rôle primordial dans la consolidation osseuse normale, mais on connaît encore très peu leur implication dans le développement des pseudarthroses.

Brownlow *et al* (13) ont étudié par immunohistochimie l'expression de différents facteurs de croissance sur un modèle animal de pseudarthrose expérimentale par rapport à une consolidation osseuse normale. Ils en déduisent que l'expression du TGF- β , du FGF-2, du PDGF et des BMP-2 et 4 est équivalente entre les pseudarthroses et une consolidation normale avec une importante expression une semaine après

la fracture puis une baisse de l'expression des ces facteurs comparable dans les deux groupes.

Kloen *et al* (65) ont étudié la présence des BMP-2,4 et 7 au niveau des pseudarthroses ainsi que la présence des récepteurs des BMP chez l'homme ; ils les retrouvent de manière fonctionnelle. Ces résultats sont en faveur, contrairement à ce qui peut être admis, que l'évolution vers la pseudarthrose n'est pas due à un déficit en ces facteurs au niveau local.

Cependant pour Nikura *et al* (88), qui ont étudié l'expression des BMP-2 à BMP-7 ainsi que leurs antagonistes dans les pseudarthroses par rapport à une consolidation normale, il existe un déficit de BMP dans les pseudarthroses. En effet normalement il existe une expression des BMP qui est régulée par leurs antagonistes. Dans les pseudarthroses, il retrouve un déficit des deux en faveur non d'un antagonisme trop important mais dû à un déficit primaire en BMP.

4. Les techniques thérapeutiques des pseudarthroses

4.1 Les techniques d'ostéosynthèse

4.1.1 L'enclouage centromédullaire

Les premières ostéosynthèses intra médullaires ont été proposées il y a maintenant plus d'un siècle (98) dans le traitement des fractures. Kuntschner a développé, dans les années quarante, son clou en forme de trèfle qui est le précurseur des clous que nous connaissons actuellement. Les avantages du clou sont nombreux. Grâce à sa topographie, il répartit les contraintes sur toute la longueur de l'os permettant une remise en charge souvent plus rapide que pour les autres techniques d'ostéosynthèse et diminuant le risque de faillite du matériel. De plus l'insertion du clou à foyer fermé diminue les traumatismes sur les tissus mous, le déperiostage et le taux d'infection, et augmente le potentiel de consolidation. Enfin grâce au réalésage dans le foyer de pseudarthrose, il permet de relancer les processus de consolidation, s'apparentant à une greffe osseuse in situ.

Les inconvénients du clou dans le traitement des pseudarthroses sont d'une part des indications limitées quand il existe une perte de substance osseuse ou lorsque le foyer à traiter est périarticulaire. D'autre part quand des complications surviennent avec cette technique, elles peuvent être difficiles à gérer : risque de pandiaphysite lors des complications septiques, extraction de clous cassés.

L'enclouage centromédullaire est utilisé depuis les années 1970 dans le traitement des pseudarthroses du tibia et du fémur. C'est une technique fiable dans le traitement des pseudarthroses aseptiques, mais son utilisation doit être prudente dans les foyers avec antécédents septiques ou faisant suite à une ostéosynthèse par fixateur externe, le taux de complications septiques, parfois majeures, pouvant atteindre dans ces cas 20% (98, 127).

4.1.2 L'ostéosynthèse par plaque

Cette technique a été décrite pour la première fois en 1886. Puis elle a été progressivement améliorée dans les années quarante avec l'apport de la compression, d'abord par Danis puis par Muller.

Les avantages de l'ostéosynthèse par plaque sont d'une part sa fixation rigide permettant une mobilisation précoce des articulations adjacente

D'autre part l'abord du foyer de fracture permet de corriger des défauts de réduction lors de la cure de la pseudarthrose et facilite des greffes osseuses, si nécessaire. Enfin l'ostéosynthèse par plaque est possible sur tous les segments osseux, contrairement à l'enclouage, et a une place de choix dans le traitement des pseudarthroses péri articulaires.

Ses désavantages sont la nécessité de différer la remise en charge jusqu'à la consolidation, et une tenue des vis qui peut être compromise par une pauvre qualité osseuse. L'arrivée ces dernières années des plaques à vis verrouillées va probablement diminuer cet inconvénient qui réside principalement dans la nécessité d'un abord large du foyer de pseudarthrose augmentant la dévascularisation du site et le risque septique ; de plus ces plaques en compression inhibent la vascularisation périostée.

Les contraintes rigides induites par ce type de matériel peuvent suffire à provoquer la consolidation dans les pseudarthroses hypertrophiques. Toutefois, en cas de berges sclérotiques ou de défaut osseux, ces plaques doivent être systématiquement associées à une greffe complémentaire.

4.1.3 L'ostéogénèse par distraction

Cette technique date du début des années trente, mais n'a pas eu un grand essor jusqu'à

Ilizarov (57). Cette procédure, initialement mise au point pour le traitement des inégalités de longueur des membres, a été élargie à la prise en charge des pseudarthroses et des pertes de substances osseuses segmentaires. Après résection en zone saine de la pseudarthrose, on effectue une corticotomie, puis on réalise le transport du segment osseux

intermédiaire d'un millimètre par jour, jusqu'à combler la perte de substance osseuse induite par la résection. Au niveau du site de corticotomie, qui s'agrandit, on observe une ostéogenèse, appelée régénérat, qui est une véritable formation osseuse *de novo*, qui fait de cette technique de distraction, un procédé unique.

Les avantages sont sa capacité à combler des pertes de substance étendues sans avoir recours à des greffes osseuses de grande taille ou des greffes vascularisées. D'autre part sa fixation stable permet une mise en charge précoce. Celle-ci favorise la consolidation par la mise en tension des broches créant un effet ressort avec une mise en compression-distraction du foyer stimulant l'apparition du cal (57). De plus on peut compenser, en plus de la correction de longueur, des déformations axiales par modélisation sur ordinateur (Taylor Spatial Frame, Smith Nephew®). Enfin l'angiogénèse progressive est favorable à la restauration de la vascularisation.

L'inconvénient principal est la tolérance et la compliance des patients à cette technique, par son aspect esthétique et son encombrement. D'autre part il semble exister une courbe d'apprentissage longue du fait de la difficulté technique de mise en place du cadre. Enfin la surveillance doit être étroite et le cadre adapté régulièrement.

La littérature met en évidence les difficultés de cette technique d'ostéogenèse par distraction.

La durée d'immobilisation dans le fixateur est en moyenne de deux mois par centimètre d'allongement, une double corticotomie diminuerait ce délai. Souvent la zone de résection ne consolide pas spontanément, nécessitant une greffe secondaire. D'autres complications mineures peuvent survenir : irritation au niveau des broches, fusion précoce du régénérat, rupture de broches. Green (60) ne met pas en évidence de différence entre l'ostéogénèse par distraction et une greffe spongieuse sur la consolidation, mais il existe une nette diminution des complications avec la distraction du fait de l'absence de morbidité d'un prélèvement iliaque, ce que retrouve Marsh (80). Ainsi cette méthode est indiquée

dans la prise en charge des pseudarthroses chez des patients compliants, ayant intégré les inconvénients de cette méthode.

4.2 Les greffes osseuses

4.2.1 La greffe osseuse autologue

La greffe osseuse autologue est utilisée depuis plus d'un siècle. Elle s'est imposée comme traitement de référence des pseudarthroses depuis plus de cinquante ans, en particulier suite aux travaux de Phemister en 1947. Cette greffe permet d'apporter tous les éléments nécessaires à la consolidation : facteurs de croissance, matrice osseuse, cellules souches.

Elle présente des propriétés ostéogéniques, ostéoinductives et ostéoconduites (tableau 3). Elle peut être de plusieurs types. Corticale pure, elle a progressivement été abandonnée.

Actuellement les greffes utilisées sont spongieuses et cortico-spongieuses vascularisées ou non. Elles présentent plusieurs modes d'utilisation : apposée (manchonement d'un foyer par du spongieux), comblement (en cas de défaut parcellaire), encastrée dans une tranchée (greffe en inlay), ou vissée en pontant le foyer de pseudarthrose.

Propriétés	Spongieux	Cortical non vascularisé	Cortical vascularisé
Ostéoconduction	++++	+	+
Ostéoinduction	++	+/-	+/-
Ostéogenèse	+++	-	++
Solidité immédiate	-	+++	+++
Solidité 6mois	++	+++	+++
Solidité 1an	+++	+++	+++

Tableau 3: Propriétés des greffons osseux autologues

La consolidation de ces greffes autologues évolue en deux phases. Pendant la première, le premier mois, l'ostéogénèse provient des cellules de la greffe. Lors de la deuxième phase, ce sont les cellules hôtes qui

contribuent à ce processus. Les greffes spongieuses sont facilement intégrées au site hôte. Mais elles participent à la consolidation surtout par leur rôle ostéoconducteur, par leur substrat qui permet la prolifération des vaisseaux et l'infiltration de nouveaux ostéoblastes et de leurs précurseurs. La source principale de spongieux est au niveau des crêtes iliaques, mais on peut le prélever aussi au niveau du tubercule de Gerdy ou de l'extrémité distale du radius ou du tibia. Les greffes spongieuses ont leur indication dans les pseudarthroses avec une perte de substance inférieure à 5 cm, et qui ne nécessitent pas de propriétés mécaniques de la greffe.

Les sources de greffes cortico-spongieuses vascularisées ou non sont le péroné, les côtes et les crêtes iliaques. Elles peuvent être greffées avec ou sans leur pédicule vasculaire. Ces greffes sont peu ostéoinductives mais plutôt ostéoconductrices et probablement ostéogéniques par la survie de leurs ostéoblastes. Les greffes corticales procurent au site receveur des qualités mécaniques, même si les greffes non-vascularisées pendant les six premières semaines s'affaiblissent, du fait de leur résorption et de leur revascularisation. Les greffes vascularisées, elles, consolident rapidement à l'interface greffon-hôte.

Malgré leurs propriétés mécaniques, ces greffes doivent être stabilisées par une ostéosynthèse interne ou externe pour les protéger de fractures pendant leur période d'hypertrophie. Les greffes cortico-spongieuses sont indiquées lorsque les défauts segmentaires atteignent 5-6 cm. Pour les défauts supérieurs à 12 cm, les greffes vascularisées sont préférées, leur taux de consolidation atteignant 75%, contre 50% pour les non vascularisées.

Les avantages des greffes osseuses autologues sont leurs très bons taux de consolidation (68), leur faible risque de transmission de maladie, et leur parfaite histocompatibilité. Même s'il existe un stock osseux relativement important, celui-ci n'est pour autant pas illimité. Les avantages des techniques vascularisées (118) sont d'une part la conservation de la vascularisation qui permet une meilleure lutte contre l'infection, et d'autre part, en association avec un lambeau, elles permettent des gestes de couverture osseuse.

La principale complication de ces greffes reste la morbidité de leurs sites de prélèvement. Au niveau des crêtes iliaques, la littérature rapporte entre 10% et 40%h de complications suivants les études (106, 116, 130), dont plus du quart de complications sévères. Elles incluent infection, hématome sévère, réintervention, douleurs chroniques sur le site donneur, pertes de sensibilité définitives, atteinte du nerf fémoro-cutané, fractures de l'épine iliaque antéro-supérieure, perforation de l'aile iliaque, ouverture de l'articulation sacro-iliaque, plaie de l'artère fessière dans l'échancrure sciatique, éventrations. Les complications mineures comportent des cicatrices inesthétiques, des problèmes de cicatrisation, des infections superficielles, des difficultés de déambulation, une gêne au port des habits.

Ainsi, les greffes osseuses autologues restent, pour l'instant, le traitement de référence des pseudarthroses, mais il faut garder à l'esprit la morbidité qui peut en résulter.

4.2.2 Les allogreffes osseuses

Les greffes allogéniques sont disponibles sous plusieurs formes : matrice osseuse déminéralisée, copeaux morcelés et spongieux, greffe spongieuse ou cortico-spongieuse, et greffes massives ostéocondrale ou segmentaire.

Les matrices osseuses déminéralisées sont des matériaux avec des propriétés ostéoinductives et peut-être ostéoconductive. Elles ne possèdent pas de propriétés mécaniques, mais remplissent aisément des pertes de substance osseuse ou des cavités. Leur revascularisation se fait rapidement. Elles sont préparées par de procédés standardisés dans lesquels l'os est concassé ou pulvérisé en particules de petites tailles (74 à 420µm) puis déminéralisé par des bains d'acide chlorhydrique, s'ajoutent des traitements variés de dégraissage et d'irradiation.

L'activité biologique de ces matrices est probablement due à des protéines et des facteurs de croissance présents dans la matrice extracellulaire, rendus assimilables par les cellules hôtes par les procédés de déminéralisation (33).

Les capacités ostéoinductives peuvent varier suivant le conditionnement, la fabrication, les procédés de stérilisation et d'un donneur à l'autre, pouvant être à l'origine d'une efficacité inégale suivant les types et les lots (128). Le second inconvénient est la transmission, au moins théorique, d'agents viraux, même si on n'en déplore pas pour l'instant.

Les matrices osseuses déminéralisées seraient un bon support pour les greffes de moelle osseuse. Connolly *et al* (17, 21, 124) les utilisent en mélangeant 10 mg de matrice osseuse déminéralisée avec la moelle osseuse concentrée, augmentant ainsi ses qualités ostéoconductrices et ostéoinductives par l'apport de cellules souches sur la matrice. On peut les utiliser en adjuvant de greffes autologues quand la quantité d'os disponible est limitée ou le défaut osseux important. Elles peuvent être utiles chez des patients récusés pour un geste à ciel ouvert ou avec un stock osseux limité compte tenu de leur injection percutanée possible.

Actuellement les industries proposent un grand nombre de ces produits, déclinés sous toutes sortes de forme : pâte, gels, copeaux, mastic. Ils assènt leurs avantages et leur supériorité sur les autres produits, bien qu'à l'heure actuelle il existe peu d'arguments scientifiques pour confirmer leurs promesses. On ne dispose à l'heure actuelle d'aucune étude randomisée contrôlée comparant l'efficacité de ces matrices osseuses déminéralisées aux greffes osseuses autologues chez l'homme, en particulier dans les fractures fraîches.

4.3 les facteurs de croissance

4.3.1 Les bone morphogenetic proteins (BMP)

Sur les différentes études analysant l'activité des facteurs de croissance, les BMP ont attiré l'attention par leur capacité à induire une formation osseuse. Seule une partie des BMP a montré sa capacité à induire une ossification enchondrale d'elle-même : ce sont les BMP 2 à 7 et la BMP-9. Chacune de ces BMP semble agir à des stades différents des processus de différenciation. Alors que les BMP 2, 6 et 9 semblent agir sur la différenciation des progéniteurs en pré-ostéoblastes, les BMP 4 et 7 agissent préférentiellement sur la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes.

Bien que plusieurs types de BMP soient reconnues comme étant ostéoinductives, actuellement seules deux BMP recombinantes ont été développées pour des applications cliniques : rhBMP-2 et rhBMP-7 (osteogenic protein 1, OP1). C'est en 2001, que la FDA américaine a reconnu l'usage de l'OP1 dans le traitement des pseudarthroses récalcitrantes comme une alternative aux autogreffes osseuses. Cette rhBMP-7 utilisée est une association d'une rhBMP-7 (3,5mg) avec une matrice collagénique de type 1 bovine (lg). C'est une poudre blanche lyophilisée qui forme une pâte avec l'adjonction de sérum physiologique, qui sera implanté au niveau du site opératoire de pseudarthrose. Les possibilités de BMP injectables pourront peut-être permettre le traitement percutané des pseudarthroses par BMP (110).

En 2004, la même FDA a autorisé l'utilisation de rhBMP-2 dans la prise en charge aigue des fractures de jambe ouvertes après enclouage centromédullaire et couverture cutanée.

Concernant ces BMP, se pose encore le problème de leur innocuité à long terme : de nombreux tissus possèdent des récepteurs aux BMP et notamment à la BMP-7, il existe aussi des tumeurs comme les ostéosarcomes, les chondrosarcomes, les tératocarcinomes qui possèdent ces récepteurs. On ne note aucune évolution maligne reportée à ce jour.

D'autre part il semble exister un certain nombre d'immunisations anti-BMP ou anti-collagène aux environ de 5% (91).

La littérature est riche en études cliniques sur les BMP (28, 38,44, 46, 55, 61, 66, 67, 77, 91, 99, 122, 126, 127). Trois études à haut niveau de preuves (annexe 2) sont à retenir: celle de Govender *et al* pour la BMP-2 et celles de Mc Kee *et al* et de Friedlaender *et al* pour les BMP-7. Il apparaît que les BMP-2 utilisées dans les fractures fraîches diminuent le risque de réinterventions secondaires, accélèrent la vitesse de consolidation et diminuent le taux d'infection dans les fractures ouvertes stade 3A et 3B de Gustilo, comme le montre l'étude de Govender *et al* (46). Mc Kee *et al* (128) ont montré la diminution du taux de réinterventions après injections de rhBMP-7 au niveau du foyer dans les fractures ouvertes de jambe, sans observer d'augmentation significative du taux de consolidation.

Pour le traitement des pseudarthroses de jambe, Friedlaender *et al* (38) ont mis en évidence, avec un niveau de preuve élevé (annexe 2), l'absence de différence de taux de consolidation entre l'utilisation de rhBMP-7 et d'une greffe osseuse autologue. De plus ils montrent la diminution du taux d'infections de manière significative et la moindre morbidité par rapport au site donneur.

4.3.2 Le platelet-rich plasma (plasma enrichi en plaquettes)

Après une fracture ou une intervention chirurgicale, les plaquettes sont activées par la thrombine et le collagène, avec comme conséquence le relargage de leurs granules à dans l'environnement local. Ainsi la fracture ou l'hématome contiennent un groupe de facteurs de croissance dérivés des plaquettes, qui peuvent stimuler la formation de nouveaux vaisseaux, l'invasion des cellules souches, et l'agrégation des plaquettes. Ainsi ces facteurs ne stimulent pas directement la formation osseuse, mais peuvent être compris comme des facteurs ostéopromoteurs. Ils agissent comme signal aux différentes cellules et activent les fonctions de réparation, comme la migration cellulaire, la prolifération, la différenciation, et l'angiogénèse.

Ainsi pour accroître ces mécanismes présents dans la phase précoce de consolidation osseuse, des stratégies de concentration plaquettaire ont vu le jour. Elles ont pu montrer dans certaines études

cliniques l'augmentation de l'angiogénèse (73) et de la vitesse d'intégration des allogreffes (73) ou des autogreffes (64). Mais aucune étude randomisée n'a pu mettre en évidence une augmentation d'efficacité avec leur usage.

4.4 Les céramiques de phosphate de calcium(76).

Les céramiques sont des matériaux non organiques dont la structure générale est biphasique : une phase vitreuse (matrice), et une phase cristalline (aiguilles cristallisées). Elles possèdent des propriétés intéressantes avec une haute résistance à la corrosion, des qualités mécaniques pour les céramiques denses, ainsi que des propriétés électriques et ioniques. Il existe différentes familles de céramiques suivant leur composition. En orthopédie sont utilisées les céramiques de phosphate de calcium : phosphates tricalciques β (PTC), hydroxyapatites synthétiques ou biologiques (HAP), les composés biphasés (HAP/PTC), ou triphasés (HAP/PTC/DCPD).

Elles sont préparées par synthèse chimique et se présentent sous forme de poudre au départ.

Puis elles subissent différentes opérations : après calcination, la poudre est compactée sous pression puis chauffée, c'est le frittage. Il y a alors fusion des constituants, puis agglomération des microcristaux qui se forment au refroidissement et restent soudés. Les interstices entre les microcristaux déterminent la microporosité, puis par addition de naphthalène, les micropores deviennent des macropores.

Ces céramiques sont bioactives, ont donc des échanges chimiques avec les tissus vivants.

Après implantation, elles sont dissolues et dégradées suivant leurs compositions et leurs structures, ce qui aboutit à la précipitation des cristaux d'apatite : processus de calcification.

Ensuite peut se produire le processus d'ostéoconduction et de remodelage osseux haversien. Elles nécessitent un contact intime avec l'os et l'absence totale de mouvement avec celui-ci. Par ailleurs ce type de

céramique possède des qualités mécaniques très faibles et une certaine fragilité. Leur utilisation est aisée pour combler des pertes de substance. En cas d'extrusion dans une articulation, elles ne se dissolvent pas. Mac Andrew *et al* (88) ont utilisé le phosphate tricalcique dans le traitement des pseudarthroses en association à une greffe osseuse spongieuse avec des taux de consolidation de 85% à un an. Perrier *et al* (85) ont obtenu 80% de consolidation de pseudarthroses de la diaphyse humérale traitées par greffe de céramique phosphocalcique et greffe de moelle osseuse autologue. Ainsi ces céramiques semblent être un très bon support ostéoconducteur pour les substances ostéoinductrices comme la moelle osseuse. Actuellement les indications reconnues restent surtout les fractures fraîches avec perte de substance osseuse épiphysaire où elles semblent être aussi efficaces que les greffes osseuses autologues (26).

4.5 Les procédés physiques

4.5.1 Les ultrasons pulsés de haute intensité (Exogen® Smith Nephew®)

Les études animales ont montré que l'utilisation des ultrasons pour stimuler la consolidation osseuse augmentait le volume du cal et la vitesse de consolidation osseuse. Le mécanisme d'action des ultrasons de faible intensité serait relatif au potentiel électrique (piézoélectrique) et non aux effets thermiques. Plus évident est le stimulus mécanique direct.

L'accélération de la consolidation pourrait être médiée par une augmentation des prostaglandines E2. Les cultures chondrocytaires exposées aux ultrasons *in vitro* montrent l'augmentation des niveaux d'expression d'ARNm des aggrecan (aggregating chondroitin sulphate proteoglycan), suggérant une action directe des ultrasons sur l'expression des aggrecans. Une augmentation de l'ossification enchondrale a été démontrée chez la souris utilisant des ultrasons de faible intensité (89).

Les études prospectives, randomisées, en double-aveugle, contre-placebo, ont montré la diminution de 40% du délai de consolidation clinique et radiologique des fractures fraîches de la diaphyse tibiale et du radius distal (15). Il semble y avoir une diminution de l'efficacité chez les fumeurs (89). Dans les études sur les pseudarthroses le taux de consolidation varie entre 70% et 85% (89, 109). L'efficacité est améliorée par la précocité du traitement (59).

4.5.2 Les champs électromagnétiques pulsés (Physio Stim® Orthofix®)

Les champs électromagnétiques sont délivrés par deux électrodes posées sur le membre de manière opposée. Quand les ondes sont pulsées, un courant faible, variant dans le temps, traverse les tissus, courant similaire à celui créé par l'os en réponse à des déformations.

Ce courant déclenche la minéralisation du foyer et induit la consolidation. Alors que de nombreuses études sont présentes dans la littérature, il existe des différences de matériel suivant les équipes tant au niveau de l'intensité du champ magnétique à appliquer, que de la forme du champ à créer.

Les taux de consolidation dans cette technique varient dans la même fourchette que pour les ultrasons entre 70% et 90% (25, 31, 58, 102, 108, 115). On ne retrouve qu'une seule étude de niveau 1 de preuve scientifique (117). Elle met en évidence un taux de consolidation de 89% contre 50% avec le placebo, avec 100% chez les non fumeurs contre 67% chez les fumeurs.

Les techniques de champs magnétiques et d'ultrasons, par des moyens différents semblent cependant activer les mêmes mécanismes de consolidation avec une morbidité nulle.

4.5.3 Les ondes de choc extracorporelles

Les lithotripsies sont devenues une procédure standard en urologie. Les calculs urétéraux requièrent une fréquence et une énergie importante pour leur fragmentation. Ainsi certains ont essayé par des études expérimentales d'évaluer l'absorption des ondes de choc dans les structures osseuses. Les mécanismes d'action de ces ondes sont mal connus. Les études animales ont montré un effet dose dépendant sur l'ostéogénèse et sur la transformation du cal en os lamellaire mature. Ces effets seraient peut-être dus à un phénomène local de décortication et de fragmentation conduisant à une stimulation de l'ostéogénèse. Au stade précoce de stimulation, histologiquement, il existe des hémorragies et une destruction trabéculaire de la moelle osseuse associées à une détérioration du périoste avec des hémorragies sous-périostées. Au stade plus tardif, on observe un développement osseux périoste et endosté. Une théorie de

mécanisme serait la création de microfractures, avec détérioration des fibroblastes et induction d'une angiogénèse stimulant la formation du cal (8).

Les indications des ondes de choc extracorporelles en orthopédie sont principalement les pseudarthroses, les tendinopathies calcanéennes, les épicondylites, les épines calcanéennes.

Il n'existe pas d'études prospectives randomisées concernant le traitement des pseudarthroses par ondes de choc. Les résultats cliniques sont très variables suivant les études allant de 40% à 90% (8, 107). Les pseudarthroses atrophiques semblent être un facteur péjoratif sur la consolidation. De plus, les techniques employées, différentes par l'énergie et le type d'application, rendent les comparaisons difficiles. Il n'existe pas d'argument fort quant à leur efficacité dans le traitement des pseudarthroses (7).

3.5.4 Le brassard fonctionnel de Sarmiento

Sarmiento a introduit, en 1967, un nouveau concept de traitement des fractures de jambe basé sur trois principes :

- l'immobilisation des articulations sus et sous-jacentes n'est pas indispensable à la consolidation ;
- la reprise fonctionnelle précoce favorise l'ostéogénèse ;
- l'immobilisation stricte du foyer de fracture n'est pas une condition préalable à la guérison des fractures.

Son appareil est appliqué entre le 12^e et le 15^e jour après le traumatisme. Il comporte (figure 11) :

- une emboîture supérieure inspirée de celle des prothèses d'amputation de jambe comportant un bouclier antérieur remontant à trois travers de doigts au-dessus du bord supérieur de la rotule, moulé sur le tendon rotulien, prolongé par des ailettes latérales anti rotatoires appliquées sur les joues condyliennes et laissant totalement libre le creux poplité. Ainsi est obtenue une liberté articulaire tout en préservant la stabilité rotatoire ;
- le manchon plâtré, proprement dit, appliqué à contact étroit sur la jambe et moulé sur les tubérosités tibiales. Ce contact « total étroit » transforme le segment jambier, selon la théorie de Sarmiento et en raison de la nature inextensible des aponévroses jambières enveloppant les muscles, en un

système indéformable et incompressible qui «encapsule», stabilise la fracture et s'oppose aux angulations et au raccourcissement ;

- la partie distale s'arrête au cou de pied en venant s'appuyer sur les malléoles, les rebords antérieur et postérieur étant échancrés pour permettre les mouvements du cou de pied. Une articulation en plastique munie d'une coque talonnière est fixée sur cette extrémité ; elle permet le port d'une chaussure. C'est le « functional brace ».

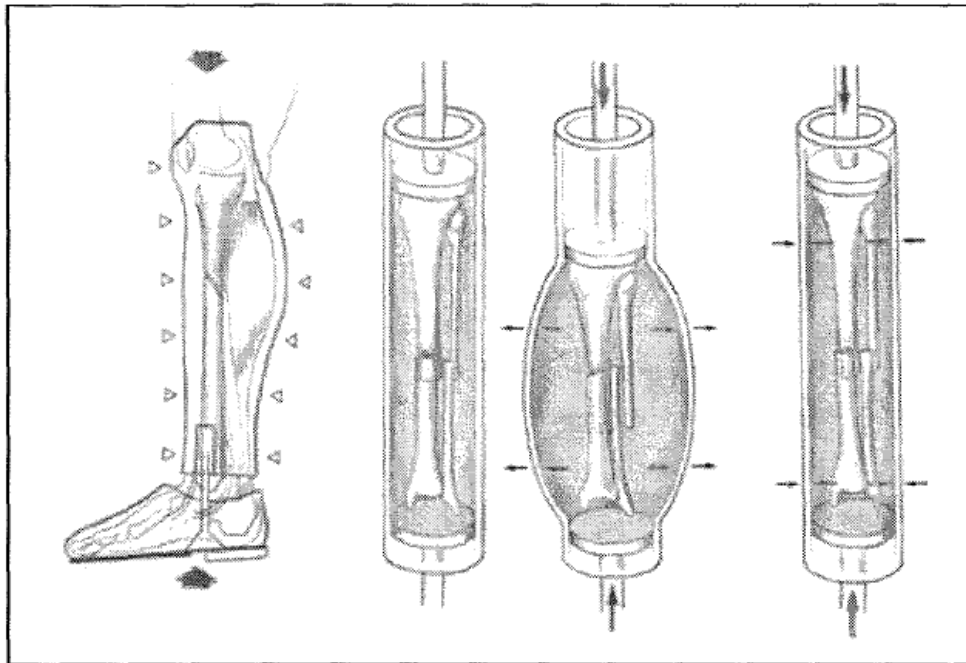


Figure 16: Principe du brassard de Sarmiento

Les études cliniques et en laboratoire de Sarmiento *et al* (112) ont montré sur les fractures fraîches que la mobilité du site fracturaire induite par la mise en charge est favorable à l'ostéogénèse. De plus le cal induit posséderait de meilleures propriétés mécaniques qu'avec une immobilisation rigide. Le principe est celui d'un système de piston hydraulique, la mise en charge et la contraction musculaire dans un manchon inextensible, permet de garder la réduction des fractures, même instables, et d'appliquer une compression axiale intermittente sur le foyer de fracture, analogue au clou dynamique.

Cette technique a largement été étudiée sur les fractures fraîches, mais on ne retrouve qu'une étude sur le traitement des pseudarthroses (112). Plus de 90% des cas ont évolué vers la consolidation, mais dans les deux tiers des cas, cette méthode était précédée d'une ostéotomie fibulaire, et dans 15% des cas d'une greffe iliaque. La méthode utilisée place plus la méthode de Sarmiento comme un traitement adjuvant à la

cure de pseudarthrose, que comme facteur principal amenant la consolidation.

5.la thérapie cellulaire :

La technique de ponction-concentration-réinjection de la moelle osseuse :

5.1 Ponction

Le prélèvement est réalisé par le chirurgien au bloc opératoire, sous anesthésie générale et la moelle osseuse est mise en poche par un personnel de l'unité de thérapie cellulaire du centre de transfusion sanguine.

Pour le chirurgien (photo 3) :

- La moelle osseuse est retirée par simple ponction grâce à des trocarts multiperforés, le plus souvent au niveau des crêtes iliaques postérieures. Le patient est installé en décubitus ventral sous anesthésie générale. Le prélèvement dure une vingtaine de minutes environ. Il est réalisé par aspiration grâce à de petites seringues de 20 ml préalablement rincées à l'héparine. Le trocart est pivoté à chaque aspiration pour modifier la zone de prélèvement. Quand le trocart a fait une rotation (4 à 5 aspirations), son point d'entrée osseux est modifié. 300 à 350 ml de moelle osseuse sont ainsi conditionnés dans une simple poche sanguine contenant une solution anticoagulante ACD (acide citrique, citrate de sodium, dextrose).
- Pour le représentant du Centre de Transfusion Sanguine :

Matériel nécessaire :

- Une poche de recueil 600mL
- 500 ml de solution ACD-A (acide citrique, citrate de sodium et dextrose),
- 2 ampoules d'héparine (25000 UI)
- 2 sites de prélèvement implantables (AE9)
- Une balance pèse-poche

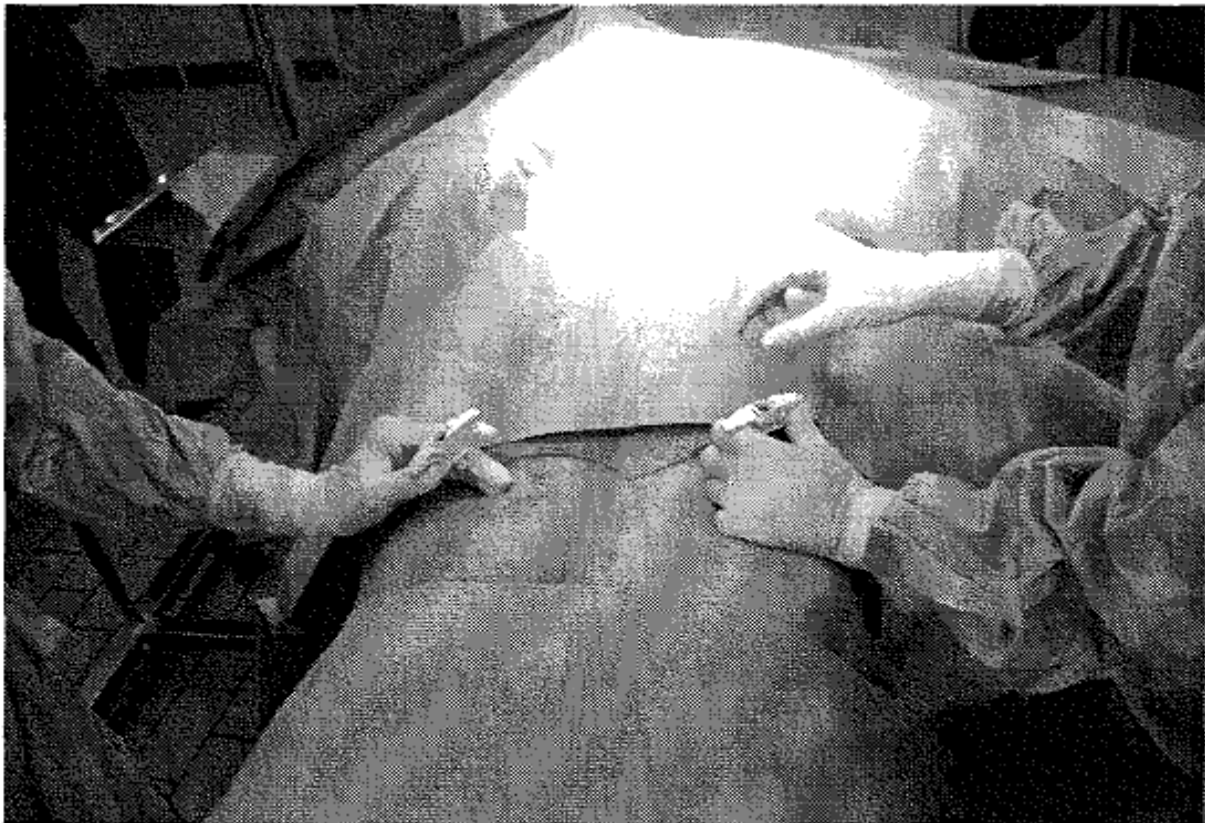
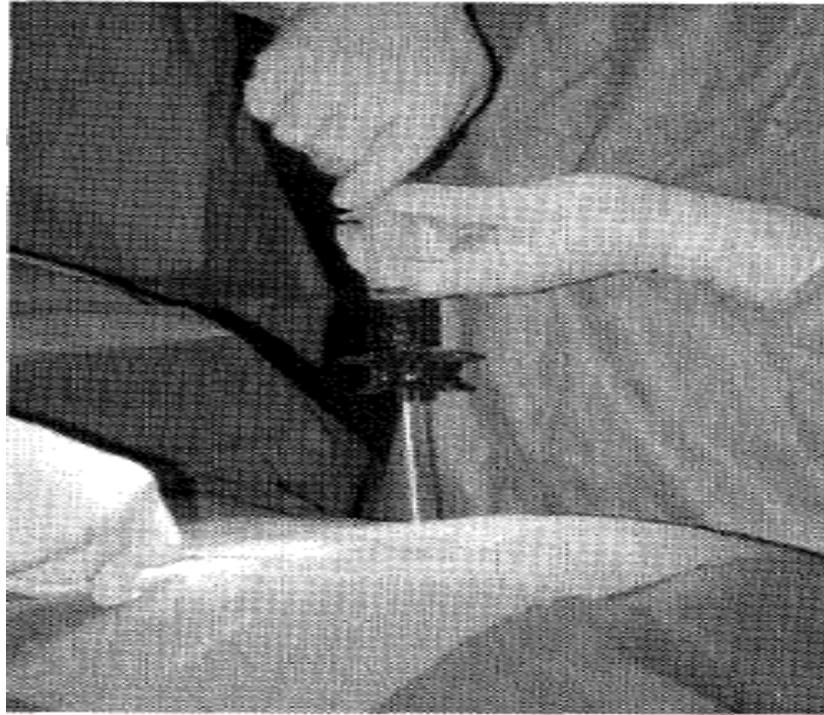


Photo 3 : Ponction de moelle osseuse



Photo 4 : Recueil et contrôle de la moelle par le technicien

Le mode opératoire comprend trois principales étapes:

- La préparation de la poche de recueil : mélanger dans une cupule inox stérile la totalité de l'ACD-A et 25000 UI d'héparine. Placer un AE9 sur une cheminée de la poche de recueil. Le reste de la solution anticoagulante servira de liquide de rinçage des seringues de prélèvement.

- Remplissage de la poche : la seringue, remplie de 10mL maximum de moelle est vidée par le site implantable dans la poche. Un contrôle visuel de la qualité du prélèvement est réalisé à ce stade, par la recherche de présence de grains au fur et à mesure de l'écoulement. Il permet de prévenir l'opérateur d'une hémodilution.

- Pesée de la poche: le volume de moelle requis est de 450 ml, la densité de la moelle étant de 1,06 la masse de la poche doit être de $450 * 1,06 = 477g$.

5.2 Concentration des cellules mononuclées

La concentration a pour but de réduire le volume de produit à réinjecter pour augmenter la concentration en cellules mononuclées et éliminer les érythrocytes. Cette manipulation est réalisée par centrifugation en circuit clos (photo5et6).

On obtient ainsi une suspension cellulaire de 50 à 70 ml appelée Buffy Coat. Cette technique est réalisée en un temps au cours de l'anesthésie générale.

Le contrôle de qualité du produit fini est réalisé à partir du prélèvement d'un échantillon de 2,5 ml au minimum pour évaluation de la viabilité cellulaire et du contenu en Colony Forming Unit Fibroblast (CFU-F)

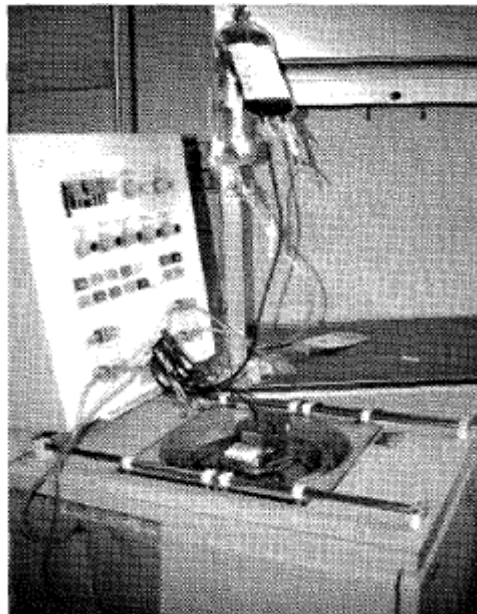


Photo 5 : Centrifugeuse COBE 2991

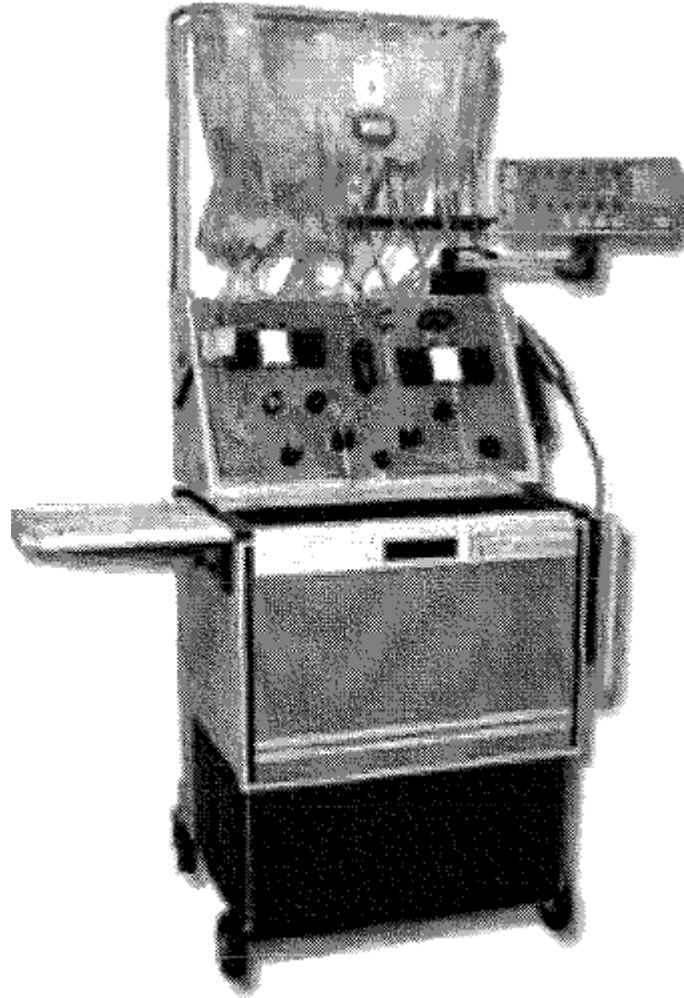


Photo 6 : Séparateur de cellules Cobe 2291

5.3 Réinjection du concentré médullaire

Pendant les 30 à 45 minutes de concentration, le patient est réinstallé en décubitus dorsal, puis préparé de façon chirurgicale pour le temps de réinjection. Le Buffy Coat est transféré au bloc dans une seringue de 50 ml. Puis il est réinjecté en percutané sous amplificateur de brillance (PHOTO7) dans le site de pseudarthrose grâce à un trocart mono ou multi perforé. Le volume réinjecté est fonction de la zone à traiter et du nombre de sites. Cette injection est lente, car elle s'effectue sous pression (environ 20 ml par minute) et doit limiter au maximum les pertes par reflux.

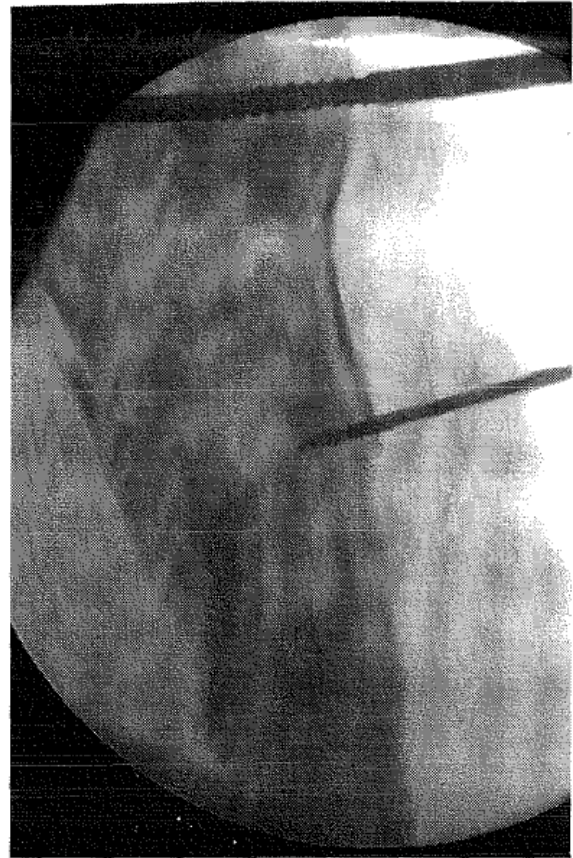
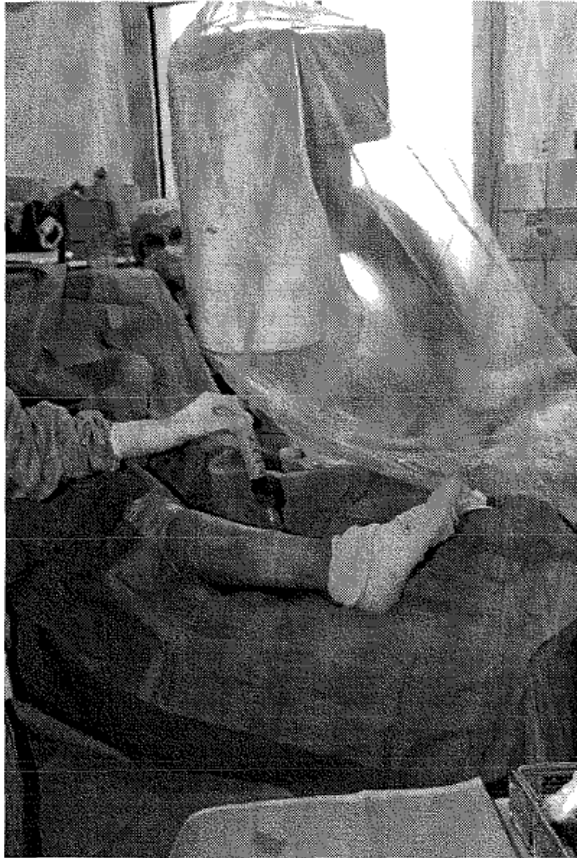


Photo 7 : Réinjection du concentré médullaire sous contrôle radioscopique

6. Analyse de la méthode opératoire

L'objectif de cette technique d'autogreffe de moelle osseuse est de pallier un défaut de consolidation osseuse. Il s'agit d'apporter un concentré cellulaire contenant des éléments permettant de relancer le processus de consolidation, en étant le moins invasif possible afin de diminuer les complications des techniques traditionnelles éprouvées.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une technique efficace qui a fait ses preuves dans le domaine des pathologies hématologiques : aplasies médullaires, leucémies, déficits immunitaires, thalassémies, drépanocytose. Elle est largement diffusée puisqu'on estime à 8000 le nombre de greffes de CSH réalisées par an dans le monde.

Le potentiel ostéogénique de la moelle osseuse est utilisé dans certaines pathologies osseuses génétiques comme l'ostéogénèse imparfaite (56) et l'ostéopétrose maligne (18).

L'origine des cellules dont la multiplication forme le cal reste encore discutée. Les partisans de l'induction ostéogénique (3) pensent que des cellules souches non ostéoformatrices n'ayant pas en temps normal la capacité de produire de l'os se différencient et vont donner naissance à des ostéoblastes. Cette technique où la consolidation a été obtenue par transplantation de moelle osseuse est en faveur de cette théorie.

Le principe de cette technique est d'apporter dans le site de pseudarthrose des cellules précurseurs de la lignée ostéogénique. Comme l'ont montré Hernigou et Beaujean (49), il existe chez les patients présentant une pseudarthrose un déficit de précurseurs, en CFU-F et en CFU-CM, aussi bien au niveau du site de la pseudarthrose qu'au niveau de la moelle des crêtes iliaques par rapport à une population de patients témoins. Ils pensent que le développement de la pseudarthrose est secondaire à un déficit en ces progéniteurs.

6.1 La ponction de moelle osseuse

Il est possible que le prélèvement de moelle lui-même participe au phénomène d'ostéogénèse à distance par un effet de stimulation, en raison du volume prélevé et de la régénération de la moelle osseuse induite. En effet Ilizarov (57) a montré que la perte de 1% de la masse sanguine chez le rat provoquait une accélération de la consolidation d'une ostéotomie et une hyperactivité hématopoïétique de la moelle osseuse des crêtes iliaques. Lippiello *et al* (69) ont mis en évidence une substance, sécrétée dans le sérum suite à une perte sanguine, qui stimule la prolifération de colonies cellulaires phosphatase alcaline positives dans le stroma de la moelle osseuse, ils l'ont appelé « ostéopoïétine » par analogie à l'érythropoïétine sécrétée au niveau rénal. Brager *et al* (11) en 2000, ont mis en évidence un peptide, une histone pouvant être cette « ostéopoïétine », qui provoque une augmentation de l'expression des différents facteurs de croissance : TGF- β , FGF-2, IGF-1, au niveau du foyer de fracture mais aussi sur le reste du squelette, ainsi qu'une accélération de la consolidation avec une augmentation de volume du cal osseux. La technique de ponction de moelle a été publiée par Fajardo *et al* en 1972 (34), et Hernigou *et al* en 2006 (53) y ajoutent des précisions techniques pour éviter la dilution de la moelle par le sang périphérique : aspirations par petits volumes, rotation du trocart à 4.5" à chaque aspiration, changement de la profondeur de ponction à chaque rotation complète du trocart. Muschler *et al* (84) ont mis en évidence la diminution de la concentration des colonies phosphatase alcaline positives avec l'augmentation du volume d'aspiration et préconisent donc un volume de 2 ml par aspiration pour diminuer l'hémodilution.

En effet, la qualité moyenne des prélèvements reste acceptable à $16 \cdot 10^6$ cellules nucléées totales par ml, mais un tiers des prélèvements a une qualité inférieure à $10 \cdot 10^6$ /ml, signant une hémodilution significative. La phase de prélèvement requiert une rigueur dans sa réalisation pour potentialiser la teneur en progéniteurs.

6.2 La concentration médullaire

La première injection de moelle osseuse percutanée pour traitement d'une pseudarthrose a été décrite par Connolly *et al* en 1986 (20). Puis en 1989, ils montrent une augmentation de l'activité ostéogénique de la moelle osseuse après centrifugation, chez le lapin, aussi bien en site hétérotopique qu'au niveau d'un site de pseudarthrose avec une amélioration des qualités mécaniques et de minéralisation (17). En 2005, Hemigou *et al* (52) montrent que le taux de consolidation, le délai de consolidation et le volume de cal osseux sont corrélés à la concentration en progéniteurs.

7- Principaux résultats des essais cliniques de l'injection de la moelle osseuse dans les problèmes de consolidation osseuse :

Les résultats cliniques sont similaires à première vue mais bien que la qualité des études s'améliore, toutes reposent sur des essais monocentriques, à faible nombre de patients.

Les critères de succès et la durée de suivi diffèrent selon les études, quand ils sont définis.

Même les définitions des fractures ouvertes ne sont pas superposables, avec l'utilisation de classifications non exactement identiques (Cauchoix, Gustillo).

Des lors il est très difficile de comparer les résultats entre les différentes études qui ont été réalisées. En effet, les caractéristiques des populations, les facteurs de risque de non consolidation, les caractéristiques des pseudarthroses, de septicité, les segments osseux sont très différents d'une étude à l'autre montrant des taux de consolidation très variables de 60% à 90% (21, 50, 105,52, 123). Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant :

ANNEE	AUTEUR	TYPE	SEPTIQUE	AGE	CONSOLIDATION	DELAI DE CONSOLIDATION	DELAI GMO	OUVERTURE CUTANEE	CFU-FINJ
1995	Connolly (21)	20 RC			90%		(3 - 6)		
1997	Hiernigou (50)	35 NU	31%	40(13 - 78)	80%	10s (4 - 16)	(6 - 1 2)	51 %	924/ml
2003	Reynders (105)	28 RC, 35 NU		33 (17 - 62)	73%	19s (6 - 32)			
2005	Hernigou-52-	60 NU		40(18 -78)	88%	12s (4 - 16)	8m (6 - 1 2)	70%	2579/ml
2007	Thepenier (123)	5 NU, 13 RC			60%	22s (9 - 43)	5m (3 - 13)	68%	3586/ml

Tableau 4 : Comparatif des études d'injection percutanée de moelle osseuse dans les retards de consolidation et pseudarthroses

RC : retard de consolidation ; NU : pseudarthrose ; Délai GMO : délai fracture - greffe de moelle osseuse ; (c) CFU-Finj : concentration
 CFU-F injectés.

7.1 Place de la greffe médullaire dans l'arsenal thérapeutique des pseudarthroses

La greffe percutanée de moelle osseuse autologue concentrée est une méthode à intégrer dans l'éventail des techniques de cure des pseudarthroses, en particulier atrophiques. C'est une méthode qui donne de bons résultats au niveau des os longs des membres inférieurs.

Pour optimiser son efficacité il convient de définir précisément ses indications. Les meilleurs résultats sont obtenus au tibia puis au fémur. Le taux de réussite pourrait être encore amélioré par un traitement plus précoce, au moment du retard de consolidation, sans attendre l'évolution vers la pseudarthrose. Cette greffe semble être plus rapidement efficace lors des traitements orthopédiques et par fixateurs externes. L'efficacité est diminuée chez les patients présentant des comorbidités: tabac, alcool, diabète, corticothérapie, radiothérapie.

Probablement que cette technique utilisée de manière isolée atteint ses limites dans des pseudarthroses récalcitrantes, l'ostéogénèse étant pris en défaut de manière plurifactorielle.

D'autre part, le caractère septique des pseudarthroses est un frein au succès de cette technique, il est nécessaire de dépister tout foyer infectieux évoluant à bas bruit pour appliquer une thérapeutique adaptée. Cette technique est efficace et pourvoyeuse d'une morbidité faible, si elle est réalisée avec rigueur aux stades de prélèvement, de concentration et d'injection.

De nombreuses interrogations persistent sur le nombre de cellules nécessaires pour relancer le processus de consolidation, les études utilisant des greffes non concentrées semblent obtenir des taux de consolidation similaires aux greffes concentrées. Par contre la vitesse de consolidation est corrélée au nombre de CFU-F injectés, ce qui est un argument pour la concentration. Pour augmenter ce nombre au niveau du site de pseudarthrose, on peut même envisager la répétition des injections à intervalles rapprochés. Ceci peut être réalisé par la congélation du concentré médullaire. De plus cet intervalle de temps pourrait être mis à profit pour réaliser des cultures d'expansion cellulaire évitant de nouvelles ponctions de moelle et augmentant le nombre de cellules souches.

L'avenir est peut-être d'orienter les cellules souches stromales vers des progéniteurs plus différenciés, mais à l'heure actuelle

on ne connaît pas le potentiel ostéogénique des cellules suivant leur stade de différenciation.

D'autre part, on pourrait utiliser *in vivo* (injection, cellules transgéniques ...) des facteurs de croissance ostéogéniques pour induire la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

CONCLUSION

Ces dernières années plusieurs innovations sont apparues pour la prise en charge des pseudarthroses. Alors que pendant longtemps la greffe osseuse iliaque était la seule alternative, actuellement, le problème devient quelle technique choisir ?

La greffe osseuse autologue reste actuellement le traitement de référence de la prise en charge des pseudarthroses. Elle seule présente à la fois des propriétés ostéogéniques, ostéoinductives et ostéoconductive. Elle a fait ses preuves dans le traitement des pseudarthroses, y compris atrophiques, septiques et récalcitrantes, bien que dans la littérature on ne trouve pas d'études la comparant à un groupe contrôle. Son principal inconvénient réside dans la morbidité du site donneur qu'elle entraîne. L'utilisation des BMP est particulièrement prometteuse, leur efficacité semble être proche de la greffe osseuse autologue, c'est la seule méthode qui a été évaluée comparativement à cette dernière. Actuellement c'est une méthode qui reste excessivement coûteuse réservée à des indications restreintes avec de nombreuses interrogations sur les conséquences à long terme de son utilisation à doses supra physiologiques.

L'autogreffe médullaire percutanée est ostéogénique et ostéoinductive, elle présente une morbidité faible et des résultats probants. Mais son efficacité doit être évaluée par des études randomisées par rapport à des groupes contrôles.

Les champs électromagnétiques et les ultrasons semblent eux aussi efficaces. Ils nécessitent des durées d'utilisation longues pour parvenir à la consolidation. Leur avantage est d'être des techniques non opératoires. L'évolution vers la pseudarthrose n'est pas le fait d'un seul facteur mais est multifactorielle. Ainsi il est probable que l'amélioration de la prise en charge des pseudarthroses se fera par l'utilisation de ces techniques de manière combinée.

ANNEXES

Annexe 1 : Classification de Gustilo des fractures ouvertes

(Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type I I I (severe) open fractures: a new classification of type I I I open fractures. J Trauma. 1984, 24, 8,742-6)

Type I :

Ouverture cutanée inférieure à 1 cm. Généralement l'ouverture se fait de l'intérieur vers l'extérieur. Il existe une petite lésion des parties molles. La fracture est souvent simple, transverse ou oblique courte avec petite comminution.

Type II :

Ouverture supérieure à 1 cm sans délabrement important ni perte de substance ni avulsion. Il existe une légère comminution et une contamination modérée.

Type III :

Délabrement cutané-musculaire, lésion vasculo-nerveuse, contamination bactérienne majeure :

III A : La couverture du foyer de fracture par les parties molles est convenable malgré la dilacération extensive. Il existe une comminution importante de la fracture sans tenir compte de la taille de la plaie.

III B : La fracture ouverte est associée à une lésion extensive ou à une perte de substance des parties molles avec stripping du périoste, exposition de l'os, contamination massive et comminution très importante due au traumatisme à haute énergie. Après parage et lavage, l'os reste exposé et il est nécessaire de recourir à un lambeau de voisinage ou à un lambeau libre pour le recouvrir.

III C : La fracture ouverte est associée à une lésion artérielle qui nécessite une réparation, mise à pari le degré important des dégâts des parties molles.

Annexe 2: Niveau de preuve scientifique de la littérature (Guide

d'analyse de la littérature et gradation des recommandations (p. 57). ANAES.Service
Recommandations Professionnelles.Janvier 2000)

Niveau de preuve scientifique de la littérature

Niveau 1	Essais comparatifs randomisés de grande puissance (risques alpha et bêta faibles) Méta-analyse
Niveau 2	Essais comparatifs randomisés peu puissants (risque alpha et bêta élevés)
Niveau 3	Essais comparatifs contemporains non randomisés Etudes de cohorte
Niveau 4	Essais comparatifs avec série historique
Niveau 5	Série de cas

Résumé

Le remodelage osseux est un processus physiologique complexe incluant des facteurs cellulaires, vasculaires, des cytokines et des facteurs de croissance. L'ostéocyte semble jouer un rôle clé déclenchant, selon les signaux reçus, ce processus. Celui-ci implique les ostéoblastes et ostéoclastes et les cellules souches progénitrices mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse. Ce remodelage osseux peut être déficitaire dans différentes affections osseuses notamment dans les pseudarthroses.

Les pseudarthroses des os longs restent un problème d'actualité en traumatologie. Si l'autogreffe cortico-spongieuse reste la technique de référence pour le traitement de ces pseudarthroses, de nouvelles thérapeutiques innovantes apparaissent comme la greffe percutanée de moelle osseuse autologue concentrée.

Cette thèse est réalisée afin d'éclaircir cette méthode, d'expliquer les différentes étapes de sa technique; de mettre en exergue ses apports et d'étaler les résultats des études réalisées sur le sujet.

Cette technique est peu invasive; elle présente peu de complications; et elle est renouvelable dans le temps sans amputation du capital osseux.

Elle peut être proposée relativement tôt dans l'évolution d'une fracture. Mais; sans essai plus vaste validant son efficacité, elle reste du domaine de la recherche Clinique.

ABSTRACT

Bone remodeling is a complex physiological process including cellular and vascular factors, cytokines and growth factors. The osteocyte seems to play an activating key role in bone remodeling, according to the received signal. This process involves osteoblasts, osteoclasts and progenitor cells which are present in bone marrow as well as in other tissues.

Non unions of long bones are still a current problem in traumatology. Although corticocancellous bone autograft remains the normal procedure for the treatment of non unions, innovative therapies like percutaneous autologous concentrated bone marrow grafting are now appearing

This thesis is conducted to clarify this method; explain the different stages of its technique; and to spread the results of studies on the subject.

Creating few complications, this method may be used several times without hindering bone resources. It could be proposed early in the evolution of a fracture. But without a larger trial demonstrating its efficiency, it remains within clinical research domain.

ملخص

تعتبر عمليات إعادة تشكيل العظام بما فيها العوامل الخلوية والوعائية وأيضا عوامل النمو والسيتوكينات عمليات صعبة ومعقدة، وبحسب الإشارات المستقبلة يبدو أن الخلايا العظمية تلعب دورا هاما في إطلاق هذه العمليات. هذا النوع من العمليات يوظف الخلايا ناقضة العظام والخلايا بانية العظام والخلايا الجذعية المولدة للخلايا المتوسطة المتواجدة في النخاع العظمي. عملية إعادة التشكيل هذه قد تكون غير ناجحة في بعض الحالات الغير طبيعية للعظم والتي تتضمن حالات عدم تجبر الكسور. ويبقى عدم تجبر كسور العظام الطويلة مشكلا معاصرا في ميدان جراحة العظام والمفاصل. إذا كانت عملية زراعة العظام الأسفنجية هي السبيل المرجعي والأمثل لعلاج حالات عدم تجبر الكسور فلا بد من ظهور طرق تجريبية جديدة لعلاج هذه الآفة مثل زراعة النخاع العظمي المركز. إن الهدف الأساسي لهذه الأطروحة هو توضيح هذه الطريقة وشرح مختلف مراحل تقنياتها واستعراض نتائج مجموعة من الدراسات التي أنجزت في هذا المجال. هذه العملية لا تتطلب عملا جراحيا معقدا كما أنها قليلة المضاعفات ويمكن إعادة إجرائها فيما بعد دون إلحاق الأذى بالرصيد العظمي للإنسان. يمكن اقتراح هذه العملية في المراحل الأولى من تطور الكسر. وفي غياب اختبارات سريرية واسعة النطاق تثبت فاعلية هذه التقنية الجديدة تبقى هذه الأخيرة محصورة في إطار البحث العلمي.

MOTS CLES:

- Pseudarthrose
- Cellules Souches Mésenchymateuses
- Greffe Médullaire
- Consolidation Osseuse
- Thérapie Cellulaire

KEYWORDS:

- Non union
- Mesenchymal Stem Cells
- Bone Marrow Grafting
- Bone Healing
- Cell Therapy

الكلمات المفتاح :

التمفصل الكاذب للعظام

الخلايا الجذعية

زرع النخاع العظمي

جبر الكسور

العلاج الخليوي.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Audige L., Griffin D., Bhandari M., Kellam J., Ruedi T.P. Path analysis of factors for delayed healing and nonunion in 416 operatively treated tibial shaft fractures.
- 2 Bareille R, Lafage-Proust MH, Fauchoux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, et al. Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials* 2000;21:1345—52.
- 3 Bennett J.H., Joyner C.J., Triffitt J.T., Owen M.E. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *Journal of cell science*, 199 1, 99, 1, 13 1-9.
- 4 Beresford J.N. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clinical orthopaedics and related research*, 1989, 240, 270-80.
- 5 Bhandari M., Guyatt G.H., Swiontkowski M.F., Schemitsch E.H. Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. *The Journal of bone and joint surgery British volume*, 2001, 83, 1, 62-8.
- 6 Bhargava R., Sankhla S.S., Gupta A., Changani R.L., Gagal K. Percutaneous autologous bone marrow injection in the treatment of delayed or nonunion. *Indian Journal of Orthopaedics*, 2007,41, 1,67-7 1.
- 7 Biedermann R., Martin A., Handle G., Auckenthaler T., Bach C., Krismer M. Extracorporeal shock waves in the treatment of nonunions. *The Journal of trauma*, 2003, 54,5,?36-42.
- 8 Birnbaum K., Wirtz D., Siebert H., Heller K. Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of nonunions. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2002, 122, 324-30.
- 9 Borden M, Attawia M, Khan Y, El-Amin SF, Laurencin CT. Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:1200—8.
- 10 Boyd H., Anderson L., Johnson D. Changing concepts in the treatment of non-union. *Clinical orthopaedics and related research*, 1965,43, 37-54.

- 11 Brager M., Patterson M., Connolly J., Nevo Z. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 2000, 82, 6, 10.
- 12 Brighton C., Hunt R. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 1991, 73, 6, 832-47.
- 13 Brownlow W.C., Reed A., Simpson A.H. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury*, 2001, 32, 7, 5 19-24.
- 14 Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. 8. Treated composite homograft-autografts of cancellous bone: an analysis of inductive mechanisms in bone transplantation. *J Bone Joint Surg Br* 1966;48:532—66.
- 15 Busse J.W., Bhandari M., Kulkarni A.V., Tunks E. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. *Canadian Medical Association journal*, 2002, 166, 4, 437-41.
- 16 Connolly J. Common Avoidable Problems in Nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*, 1985, 194, 226-35
- 17 Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am* 1989;71:684—91.
- 18 Coccia P.F., Krivit W., Cewenka J., Clawson C., Kersey Y. Successful bone-marrow transplantation for infantile malignant osteopetrosis. *The New England journal of medicine*, 1980, 302, 13, 701-8.
- 19 Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop* 1991;266:259—70.
- 20 Connolly J.F., Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *The Nebraska medical journal*, 1986, 71, 4, 105-7.
- 21 Connolly J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clinical orthopaedics and related research*, 1995, 313, 8- 18.
- 22 Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop* 1995;313:8—18. Review.
- 23 Cook S.D., Wolfe M.W., Salleid S.L., Rueger D.C. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 1995, 77, 734-50.

- 24 Csongradi J.J., Maloney W.J. Ununited lower limb fractures. *The Western journal of medicine*, 1989, 150, 6, 675-80.
- 25 Delima D.F., Tanna D.D. Role of pulsed electromagnetic fields in recalcitrant non-unions. *Journal of postgraduate medicine*, 1989, 35, 1, 43-8.
- 26 De Long W., Einhorn T., Koval K., MacKee M., Smith W., Sanders R., Watson T.
Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 2007, 89, 649-58.
- 27 [den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res* 2003;3:521—8.
- 28 Dimitriou R., Dahabreh Z., Katsoulis E., Matthews S.J., Branfoot T., Giannoudis P.V. Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions. *Injury*, 2005, 36 Suppl 4, S51-9.
- 29 D'Ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C., Roos B.A., Howard G.A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of bone and mineral research*, 1999, 14, 7, 1115-22.
- 30 Dominici M., Pritchard C., Garlits J.E., Hofmann T.J., Persons D.A., Horwitz E.M. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101, 32, 11761-6.
- 31 Downes E.M., Watson J. Development of the iron-cored electromagnet for the treatment of non-union and delayed union. *The Journal of bone and joint surgery British volume*, 1984, 66, 5, 754-9.
- 32 Drosos G.I., Bishay M., Karnezis I.A., Alegakis A.K. Factors affecting fracture healing after intramedullary nailing of the tibial diaphysis for closed and grade 1 open fractures. *The Journal of bone and joint surgery British volume*, 2006, 88, 2, 227-31.
- 33 Einhorn T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998, 355 Suppl, S7-21.
- 34 Fajardo L.F., Sarasti H. Technique for percutaneous needle biopsy of bone and marrow. *California medicine*, 1972, 117, 2, 1-4.
- 35 Finkemeier C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 2002, 84-A, 3, 454-64.

- 36 Foulk D., Szabo R. Diaphyseal humerus fractures : natural history and occurrence of nonunion. *Orthopedics*, 1995, 18,4, 333-5.
- 37 Friedenstein A., Chailakhyan R., Gerasimov U. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics*, 1987,20,3,263-72.
- 38 Friedlaender C.E., Perry C.R., Cole J.D., Cook S.D., Cierny G., Muschler G.F., Zych G.A., Calhoun J.H., LaForte A.J., Yin S.
Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 2001, 83-A Suppl 1, Pt 2, S151-8
- 39 Frost HM.— Tetracycline-based histological analysis of bone remodelling. *Calcif Tissue Res*, 1969, 3, 211-237.
- 40 Frost HM et al. The biology of fracture healing. Part 1 et Part 2. *Clin Orthop* 1989; 248: 283-93 et 294-308
- 41 Gaebler C., Berger U., Schandelmaier P., Greitbauer M., Schauwecker H.H., Applegate B., Zych G., Vecsei V.
Rates and odds ratios for complications in closed and open tibial fractures treated with unreamed, small diameter tibial nails: a multicenter analysis of 467 cases. *Journal of orthopaedic trauma*, 2001, 15,6,415-23.
- 42 Garg NK, Gaur S, Sharma S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fractures. *Acta Orthop Scand* 1993;64:671—2.
- 43 Giannoudis P.V., MacDonald D.A., Matthews S.J., Smith R.M., Furlong A.J., De Boer P. Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal antiinflammatory drugs. *The Journal of bone and joint surgery British volume*, 2000, 82, 5, 655-8.
- 44 Giannoudis P.V., Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury*, 2005,36 Suppl3, S47-50.
- 45 Gong Z., Wezeman F.H. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 2004, 28, 3,468-79.

Govender S., Csimma C., Genant H.K., Valentin Opran A., Amit Y., Arbel R., Aro H., Atar D., Bishay M., Borner M.G., Chiron P., Choong P., Cinats J., Courtenay B., Feibel R., Geulette B., Gravel C., Haas N., Raschke M., Hammacher E., van der Velde D., Hardy P., Holt M., Josten C., Ketterl R.L., Lindeque B., Lob G., Mathevon H., McCoy G., Marsh D., Miller R., Munting E., Oevre S., Nordsletten L., Patel A., Pohl A., Rennie W., Reynders P., Rommens P.M., Rondia J., Rossouw W.C., Daneel P.J., Ruff S., Ruter A., Santavirta S., Schildhauer T.A., Gekle C., Schnettler R., Segal D., Seiler H., Snowdowne R.B., Stapert J., Taglang G., Verdonk R., Vogels L., Weckbach A., Wentzensen A., Wisniewski T.C.A.B.M.P.E.i.S.f.T.T.B.S.G.

Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients.

The Journal of bone and joint surgery American volume, 2002, 84-A, 12, 2123-34.

47 Ham A.W., Harris W.R. Repair and transplantation. In: ed B.G., editor. Biochemistry and physiology of bone: New-York academic press; 1971. p. 338-99.

48 Hernigou P., Beaujean F. Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse. The Journal of bone and joint surgery American volume, 1997, 79, 7, 7-53.

49 Hernigou P., Beaujean F. Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning. Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur, 1997, 83, 1, 33-40.

50 Hernigou P, Beaujean F. Pseudarthroses traitées par greffe percutanée de moelle osseuse autologue. Rev Chir Orthop 1997;83:495—504.

51 Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. J Bone Joint Surg Br 2005;87:897—902.

52 Hernigou P., Poignard A., Beaujean F., Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. The Journal of bone and joint surgery American volume, 2005, 87, 7, 1430-7

53 Hernigou P., Mathieu G., Poignard A., Manicom O., Beaujean F., Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. The Journal of bone and joint surgery American volume, 2006, 88 Suppl 1 Pt 2, 322-7.

54 Heppenstall R. Fracture treatment and healing. Philadelphia : Saunders, 1980.- 1087p

- 55 Hidaka C., Goshi K., Rawlins B., Boachie Adjei O., Crysta! R.G.
Enhancement of spine fusion using combined gene therapy and tissue engineering
BMP-7-expressing bone marrow cells and allograft bone. *Spine*, 2003, 28, 18,2049-57.
- 56 Honvitz E.M., Prockop D. J., Gordon P.L., Koo W. W.Clinical responses to
bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis
imperfecta. *Blood*, 2001, 97, Li, 1227-3 1
- 57 Ilizarov G. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues.
Clinical orthopaedics and related research, 1989,238, 249-8 1.
- 58 Ito H., Shirai Y. The efficacy of ununited tibial fracture treatment using
pulsing electromagnetic fields: relation to biological activity on nonunion bone ends.
Journal of Nippo
- 59 Jingushi S., Mimno K., Matsushita T., Itoman M.
Low-intensity pulsed ultrasound treatment for postoperative delayed union or
nonunion of long bone fractures. *Journal of orthopaedic science* 2007, 12, 1, 35-4 1
- 60 Green S.A comparison of bone grafting and bone transport for segmental
defects. *Clinical orthopaedics and related research*, 1994,301, 1 1 1-7.
- 61 Johnson E.E., Urist M.R., Finerman C.A.
Distal metaphyseal tibial nonunion. Deformity and bone loss treated by open
reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hBMP).
Clinical orthopaedics and related research, 1990,250, 234-40.
- 62 Justesen J., Ste~denK~p., Eriksen E.F., Kussem M.
Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and
osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcified tissue international*,
2002, 7 1, 1, 36-44.
- 63 Karladani A.H., Granhed H., Karrholm J., Styf J.
The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104
consecutive tibial shaft fi-actires. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2001,
121,6,325-8.
- 64 Kitoh H., Kitakoji T., Tsuchiya H. Tansplantation of culture expanded bone
marrow cells and platelet rich plasma indistraction osteogenesis of the long bones.
Bone, 2007,40, 522-8.
- 65 Kloen P., Doty S.B., Gordon E., Rubel I.F., Goumans M.J., Helfet D.L.
Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture
nonunions. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 2002, 84-A, 1 1,
1909-1 8.

- 66 Kujala S., Raatikainen T., Ryhanen J., Kaarela O., Jalovaara P.
Composite implant of native bovine bone morphogenetic protein (BMP), collagen carrier and biocoral in the treatment of resistant ulnar nonunions: report of five preliminary cases. Archives of orthopaedic and trauma surgery, 2004, 124, 1,26-30.
- 67 Lane J.M., Yasko A.W., Tomin E., Cole B.J., Waller S., Browne M., Turek T., Gross J. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. Clinical orthopaedics and related research, 1999,36 1,2 16-27.
- 68 Lifeso R., Al-Saati F.
The treatment of infected and uninfected non-union.
The Journal of bone and joint surgery British volume, 1984, 66,4, 573-9.
- 69 Lippiello L., Chavda D., Connolly J. Colony-forming efficiency response of bone marrow stromal cells to acute blood loss. Journal of orthopaedic research, 1992, 10, 1, 145-8.
- 70 Long M.W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells.
Blood cells, molecules & diseases, 2001,27, 3, 677-90
- 71 Long M.W., Robinson J.A., Ashcraft E.A., Mann K.G.
Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. The Journal of clinical investigation, 1995, 95, 2, 88 1-7.
- 72 Louisia S, Stromboni M, Meunier A, Sedel L, Petite H. Coral grafting supplemented with bone marrow. J Bone Joint Surg Br 1999;81:719—24.
- 73 Lucarelli E., Fini M., Beccheroni A. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. Clinical orthopaedics and related research, 2005,435, 62-8.
- 74 Lucarelli E et al. Bone Reconstruction of Large Defects Using Bone Marrow Derived Autologous StemCells. Transfus Apher Sci 2004 ; 30: 169-74.
- 75 MacAndrew M., Gorman P., Lange S. Tricalcium phosphate as a bone graft substitute in trauma. Journal of orthopaedic trauma, 1988,2,333-9.
- 76 Mainard D., Gouin F., Chauveaux D., Loty B., Massin P Les substitus osseux en 2005 / éd. par GESTO Paris: Romillat, 2005.- 154p

- 77 Makino T., Hak D.J., Hazelwood S.S., Curtiss S., Reddi A.H.
Prevention of atrophic nonunion de~eloprilent by recoiribinant human bone morphogenetic protein-7.Journal of orthopaedic research, 2005,23, 3, 632-8.
- 78 Majors A.K., Boehm C.A., Nitto H., Midura R.J., Muschler G.F.
Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. Journal of orthopaedic research, 1997, 15,4, 546-57.
- 79 Marie P., Heymann D., Delecrin J., Descham C. Intérêt des facteurs de croissance dans la réparation osseuse. Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur, 2000, 86, S 1, 150-54.
- 80 Marsh D. Concepts of Fracture Union,Delayed Union, and Nonunion.
Clinical orthopaedics and related research, 1998, 3553, S22-30
- 81Meyrueis J., Cazenave A. Consolidation des fractures.
Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Elsevier SAS, Paris), Appareil locomoteur, 2004, 14-03 1 -A-20, 1 – 17
- 82 Mizuno K., Mineo K., Tachibana T., Sumi M., Matsubara S., Hirohata K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. The Journal of bone and joint surgery British volume, 1990,72,822-29
- 83 Mora R. Nonunion of the long bones : diagnosis and Treatment with compression-distraction techniques. Milan: Springer, 2006.-332p
- 84 Muschler G.F., Boehm C., Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. The Journal of bone and joint surgery American volume, 1997, 79, 1 1, 1699-709.
- 85 Muschler G.F., Nitto H., Boehm C.A., Easley K.A.
Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. Journal of orthopaedic research, 200 1, 19, 1, 17-25.
- 86 Nade S. Bone graft surgery reappraised: the contribution of cells to ultimate success. Br J Surg 1970;57:752—6.
- 87 Neidlinger-Wilke C., Stalla I., Claes L., Brand R., Hoellen I., Rubenacker S., Arand M., Kinzl L. Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors

show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain.
Journal of biomechanics, 1995,28, 12, 1411-8.

88

Niikura T., Hak D.J., Reddi A.H.

Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures.

Journal of orthopaedic research, 2006, 24, 7, 1463-71.

89 NOLTE P.A., van der kran A, patka P, Janssen IM, Ryaby J.P, Albers G.H.
Low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions.
The journal of trauma, 2001, 51, 4, 693-702.

90 Noumi T., Yokoyama K., Ohtsuka H., Nakamura K., Itoman M.
Intramedullary nailing for open fractures of the femoral shaft: evaluation of contributing factors on deep infection and nonunion using multivariate analysis.
Injury, 2005, 36, 9, 1085-93.

91 OBERT I, Couesmes A, Lepage D., Pauchot J., Garbuio P., tropet Y.
Consolidation osseuse et pseudarthrose des os longs: l'apport des BMP.
Academie nationale de chirurgie, 2007, 6, 2, 24-30.

92 Oe K., Miwa M., Sakai Y., Lee S., Kuroda R., An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity. The journal of bone and joint surgery British volume, 2007, 89, 1, 133-38

93 OWEN M
Marrow stromal stem cells.
Journal of cell science supplement, 1988, 10, 63-76

94 OWEN M, friedenstein A.J.
Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.
Ciba foundation symposium, 1988, 136, 42-60

95 OWEN ME, cave J, Joyner C.J

Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F
JOURNAL OF CELL SCIENCE, 1987, 87, 5, 731-8.

96 Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW.
Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop* 1986;208:300—12.

97 Passuti N., Waast D., Piétu G., Gouin F. Fracture diaphysaires de l'humérus chez l'adulte. Complications de la consolidation osseuse : les pseudarthroses. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur*, 2004, 90, Supp, 57-60

98 Peny C.R. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clinical orthopaedics and related research*, 1999, 360, 7 1-86.

99 Pecina M., Haspl M., Jelic M., Vukicevic S. Repair of a resistant tibial non-union with a recombinant bone morphogenetic protein-7 (rh-BMP-7). *International orthopaedics*, 2003, 27, 5, 320-1.

100 Perrier C., Philippeau J., Beudet P., Waast D., Passuti N.
Emploi des céramiques phosphocalciques biphasées dans le traitement des pseudarthroses aseptiques de la diaphyse humérale. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur*, 2006, 92, 4S, 114-5.

101 Phieffer L., Goulet J. Delayed unions of the tibia.
The Journal of bone and joint surgery ; American volume, 2006, 88, 1, 206-16.

102 Pilla A.A.
Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? *Journal of orthopaedic science* 2002, 7, 3, 420-8.

103 Plenk H, Jun, Hollman Wilfert KH. Experimental bridging of osseous defects in rats by the implantation of Kiel bone containing fresh autologous marrow. *J Bone Joint Surg Br* 1972;54:735—43.

104 Potier E., Petite H. Utilisation thérapeutique des cellules souches en orthopédie. *Patologie-Biologie*, 2005, 53, 142-48.

105 Reynders P. Intra-osseous injection of concentrated autogenous bone marrow in 62 cases of delayed union. *Folia Traumatologica Lovaniensia*, 2003, 108- 16.

106 Robertson P.A., Wray A.C. Natural history of posterior iliac crest bone graft donation for spinal surgery: a prospective analysis of morbidity. *Spine*, 2001, 26, 13, 1473-6.

107 Rompe J., Rosenthal T., Schollner C., Theis C.
High-energy extracorporeal shock waves treatment of nonunions.

Clinical orthopaedics and related research, 200 1,387, 102- 1 1.

108 Roussignol X., Costes S., Polard J. Evaluation du traitement des pseudarthroses par la technique des champs électromagnétiques : utilisation du système Orthopulse. A propos de 22 cas. Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur, 2004,90, S6, 69.

109 Rutten S., Nolte P.A., Guit G.L., Bouman D.E., Albers G.H. Use of low-intensity pulsed ultrasound for posttraumatic nonunions of the tibia: a review of patients treated in the Netherlands. The Journal of trauma, 2007, 62,4, 902-8.

110 Saito N., Okada T., Horiuchi H., Ota H., Takahashi J., Murakami N., Nawata M., Kojima S., Nozaki K., Takaoka K. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. Bone, 2003,32,4,381-6.

111 Salama R, Burwell RG, Dickson IR. Recombined grafts of bone and marrow. The beneficial effect upon osteogenesis of impregnating xenograft (heterograft) bone with autologous marrow. J Bone Joint Surg Br 1973;55:402—17

112 Sarmiento A., Burkhalter W.E., Latta L.L. Functional bracing in the treatment of delayed union and nonunion of the tibia. International orthopaedics, 2003,27, 1,26-9.

113 Seebach C., Heinrich D., Tewksbury R., Wilhelm K., Marzi I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic non unions. Calcified tissue international, 2007, 80, 294-300.

114 Sen M.K., Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions? Injury, 2007,38 Suppl 1, S75-80.

115 Sharrard W. J., Sutcliffe M.L., Robson M.J., Maceachern A.G. The treatment of fibrous non-union of fractures by pulsing electromagnetic stimulation. The Journal of bone and joint surgery British volume, 1982, 64,2, 189-93.

116 Silber J.S., Anderson D.G., Daffner S.D., Brislin E.T., Leland J.M., Hilibrand A.S., Vaccaro A.R., Albert T.J. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. Spine, 2003, 28, 2, 134-9.

- 117 Simonis R.B., Parnell E.J., Ray P.S., Peacock J.L. Electrical treatment of tibial non-union: a prospective, randomised, double-blind trial. *Injury*, 2003,34,5,357-62.
- 118 Soucacos P.N., Dailiana Z., Beris A.E., Johnson E.O. Vascularised bone grafts for the management of non-union. *Injury*, 2006, 37 Suppl 1, S41-50
- 119 Srouji S et al. Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in ageing and disease. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 28 1-7.
- 120 Stenderup K., Justesen J., Eriksen E.F., Rattan S.I., Kassem M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during . aging and in patients with osteoporosis. *Journal of bone and mineral research*, 200 1, 16, 6, 1 120-9,
- 121 Street J., Winter D., Wang J., Wakai A., McGuinness A., Redmond H. Is human fracture hematoma inherently afiogenic? *Clinical orthopaedics and related research*, 2000,378,224-37.
- 122 Takagi K, Urist MR. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop* 1982;171:224—31.
- 123 Thepenier C. La ponction-concentration-réinjection en un temps de moelle osseuse autologue dans les défauts de consolidation osseuse.- 70p Th : Méd : Nancy 1 : 2007.
- 124 Tiedeman J.J., Connolly J.F., Strates B.S., Lippiello L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clinical orthopaedics and related research*, 1991,268, 294-302.
- 125 urist M.R. Fundamental and clinical bone physiology. Philadelphia: JP Lippincott, 1980.- 41 6p
- 126 Vaccaro A.R., Anderson D.G., Toth C.A.Recombinant human osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) as an osteoinductive agent in spinal fusion. *Spine*, 2002, 27, 16 Suppl 1, S59-65.
- 127 Vaibhav B., Nilesh P., Vikram P., Anshul c. Bone morphogenetic protein and its application in trauma cases : a current concept update. *Injur-y*, 2007, doiO. 1016/j.injury.2006.12.012.
- 128 Veillette C., MacKee M. Growth factors- BMPs, DBM, and buffy coat products: are there any proven any differences among them? *Injury*, 2007,38, S1, 38-48

129 Weitzel P., Esterhai J. Delayed union, non-union and synovial pseudarthrosis.
In: Bone Formation and Repair 1 éd. par American Academy of Orthopaedic
Surgeons Rosemont, Illinois: 1994, 505-27.

130 Younger E.M., Chapman M.W. Morbidity at bone graft donor sites.
Journal of orthopaedic trauma, 1989, 3, 3, 192-95.