

RECONSTRUCTION DES PERTES DE SUBSTANCE OSSEUSE DIAPHYSAIRE : LES ACTEURS ESSENTIELS DE LA CONSOLIDATION OSSEUSE

Bone reconstruction in bone defect : essential actors of the osseous consolidation

OBERT L.* , DESCHASEAUX F.°, PAUCHOT J.* , GARBUIO P.* , TROPET Y. *

RÉSUMÉ : La consolidation osseuse reste un challenge thérapeutique surtout en cas de défaut osseux. Les greffes osseuses (auto ou allo) sont considérées comme la solution de référence dans ces situations sans pour cela permettre d'obtenir la consolidation dans tous les cas. L'utilisation de facteurs de croissance et de cellules souches mésenchymateuses dépend du support de ces inducteurs osseux. Les BMP sont considérées comme sûres et efficaces dans le traitement des pertes de substances osseuses chez l'animal et chez l'homme. En fait peu d'études sont disponibles publiées et il s'agit souvent de cas compassionnels sans groupe contrôle. Il y a en effet plusieurs écueils méthodologiques quant à la réalisation d'études comparatives et à fortiori randomisées de pseudarthroses résistantes. L'évaluation de la consolidation osseuse clinique et radiologique reste le point clé de ces travaux. Par ailleurs le rôle respectif des facteurs de risque de survenue d'une pseudarthrose reste inconnu. Dans notre expérience l'utilisation de BMP 7 dans les pseudarthroses résistantes a raccourci l'évolution et la durée de consolidation. Cependant si l'utilisation des BMP devient plus classique en pratique quotidienne l'utilisation de cellules souches reste confidentielle. L'injection de moelle osseuse n'étant pas synonyme d'injection de cellules souches. Les résultats préliminaires des études concernant les cellules souches sont encourageants. Cependant plusieurs travaux restent à faire avant de proposer aux chirurgiens ce nouvel outil plusieurs questions fondamentales restent en suspens : Quelle définition exacte de la cellule souche mésenchymateuse ? Quels types d'anticorps pour les sélectionner ? Quel support idéal pour s'adapter au défaut osseux ? Ainsi des études prospectives multicentriques concernant la reconstruction osseuse devront voir le jour à la fois pour obtenir un niveau de preuve mais aussi pour résoudre les problèmes de nos patients.

SUMMARY : Bone union remains a therapeutic challenge in case of bone defect. Autograft and allograft are used as gold standards to achieve bone healing in such difficult cases but are not followed in all cases by bone union. Using growth factors and / or mesenchymal stem cells remain depending on the scaffold of these inductor factors. BMP are reported as safe and efficacious in treatment of loss of bone in animal and in human studies. But few clinical studies are reported and only compassionate cases are available. There are many methodological difficulties to achieve comparative or randomised studies in such cases of recalcitrant non-union. Assessment of achieved union by clinical or Xray tool remains the only but criticable way. Risk factors of bone non-union, are critical factors but whose respective role in good evolution at follow up is unknown. In our experience adding BMP7 in such non-union cases have shorten the duration of treatment where amputation is sometime an issue.

However if using BMP's in non union is becoming a current practice, injection of stem cell remains a research way of treatment. In fact injection of bone marrow doesn't mean injecting stem cell. All of the reported results concerning stem cell are positive but preliminary. More peer studies have to be realised before to provide a clear procedure for the surgeons. Some questions should be resolved by data provided from basic researches. Notably, the exact definition or characterization of the BM MSCs. Furthermore, the development of specific antibodies would be of outstanding importance. The bone defect need to have an effective scaffold. Thus, the tissue engineering have to define the appropriate bio-material according to cells, the defect and the bone. Multicentric clinical trials should then provide the definitive procedure of the bone reconstruction in order to reach a level of proof but to solve clinical problem too.

INTRODUCTION

Le risque de ne pas consolider

Obtenir la consolidation osseuse lors d'une fracture n'est pas constant. Dans 10 % des fractures d'un os long, et en l'absence de facteur de risque particulier, il

existe un risque de non consolidation. A l'opposé, en cas d'erreur technique (fixation inadéquate, contrôle approximatif de la rotation, notamment dans les fractures diaphysaires des os longs), le risque de non consolidation est estimé à 50 %. Entre ces deux extrêmes, le risque de non consolidation est fonction de la présence de facteurs locaux et généraux (tableau 1) et peut atteindre 30%. Ce risque de non consolidation est évidemment égal à 100 % en cas de perte de substance osseuse centimétrique non fixée et non greffée.

* service traumatologie orthopédie et chirurgie plastique CHU Jean Minjot 25000 Besancon
° IFR 133 EFS bourgogne Franche Comté

Les acteurs humains et biologiques de la consolidation osseuse

Le projet thérapeutique en cas de non consolidation doit être bien compris par le patient dont les exigences, la compréhension et la compliance sont très variables. Ce projet doit être bien expliqué par le chirurgien. En dehors de ces acteurs humains, il existe 3 acteurs biologiques de la consolidation osseuse :

D'abord des facteurs de croissance (interleukines, protéines), ensuite des cellules (capables de se différencier en cellules osseuses et en cellules endothéliales après fixation des facteurs de croissance sur des récepteurs spécifiques) et enfin une matrice qui servira par la suite à supporter l'os qui se formera^{1,2}. Le chirurgien, qui n'a pas accès à cette étape cellulaire, va contribuer à la consolidation en assurant une fixation stable et en permettant une « stimulation osseuse » ne détruisant pas le tissu formé au cours de la consolidation. En cas de perte de substance osseuse, l'autogreffe, solution classique en cas de non consolidation osseuse, apporte ces 3 acteurs biologiques essentiels et peut suffire dans les pertes de substance osseuse inférieures à 3 cm. Au-delà, l'autogreffe cortico-spongieuse libre ne permettra pas d'obtenir la consolidation. Ainsi plusieurs auteurs au cours du temps ont optimisé ces autogreffes en proposant des greffes osseuses vascularisées. Plus récemment, Masquelet³ a proposé une optimisation de l'autogreffe avec la technique de la membrane induite, technique en 2 temps, non microchirurgicale. Cette technique permet de résoudre des situations difficiles de pseudarthrose septique avec défaut osseux important (jusqu'à 35 cm) où l'amputation est parfois la dernière chance et où la poursuite des gestes microchirurgicaux sur un membre avec un axe artériel unique serait risquée. Cette technique permet de créer une membrane à corps étranger en réalisant une chambre d'induction osseuse, la membrane induite, sécrétant des facteurs de croissance^{4,5}. L'allogreffe a pour sa part montré ses limites dans ces situations extrêmes avec une colonisation difficile à évaluer. Cependant, l'autogreffe iliaque pour des petites pertes de substance ou lors de son prélèvement pour le deuxième temps de la technique de Masquelet, prélevée au niveau des crêtes iliaques antérieures, n'est pas exempte de complications avec 30 % de morbidité observée selon les travaux⁶.

Ainsi, traiter une pseudarthrose avec défaut osseux est synonyme « d'unité de lieu » (illustrée par la technique de Masquelet et nécessitant la présence des 3 acteurs biologiques dans un espace clos et stable), « d'unité de temps » (la durée moyenne de consolidation se compte en trimestre ou en année, jamais en semaines...) et « d'unité de personne » (Le chirurgien et le patient doivent être en confiance et avoir compris les impératifs respectifs de chacun).

Comment extrapoler les données expérimentales et cliniques à la pratique quotidienne ? Comment le chirurgien devant une pseudarthrose peut intégrer les données publiées et les appliquer à un patient ?

La stabilité : de la fixation osseuse et des stimulations par ondes aux substituts osseux

Les habitudes opératoires ont évolué au cours du temps. La fixation chez l'adulte d'une pseudarthrose d'un os long doit probablement être rigide et il n'est plus question d'opposer le clou à la plaque. Il faudra parfois les associer en cas de perte de substance osseuse importante sur une diaphyse portante.

Par contre, l'évolution des implants (structure et matériau)⁷ a permis d'offrir aux patients une plus grande autonomie malgré la complexité du geste chirurgical.

Depuis longtemps, le rôle de l'appui est connu comme favorisant une repousse osseuse. L'orthopédiste ne maîtrise pourtant pas encore quel type de stimulation clinique va ou non entraîner une stimulation osseuse. Cependant, il a été démontré à l'échelle cellulaire qu'un stimuli mécanique à l'échelle cellulaire ostéoblastique entraîne une synthèse calcique par celui-ci. Aujourd'hui, l'utilisation des stimulations par ondes électromagnétiques ou par ultrasons semble montrer des effets sur la consolidation osseuse. Cependant, là encore, la compliance du patient est nécessaire, les cas publiés nécessitent toujours une fixation stable et ces stimulations ne sont théoriquement pas indiquées en cas de défaut osseux. L'évaluation de ces techniques de stimulation osseuse grâce aux ondes gagnerait à une plus grande rigueur méthodologique. Concernant les substituts osseux, ils constituent le domaine de l'ortho-biologie le plus en expansion. Petit à petit ces substituts osseux d'origine synthétique (céramique, phosphocalcique) gagnent des parts de marché sur les substituts d'origine animale et sur les greffes osseuses. Les céramiques biphasées idéalement doivent être ni trop macroporeuses, avec une porosité globale de 70 % et un diamètre moyen de corps de 400 microns. Plus que ces moyens, c'est la composition de ces céramiques (hydroxy apatite et calcium tri phosphate), leur pourcentage respectif (40-60? 20-80?) et surtout l'association d'une macroporosité qui permet la pénétration cellulaire et d'une microporosité qui autorise l'adhésion cellulaire, la pénétration des fluides et donc la résorption du contingent résorbable de ces céramiques. Récemment, Chouteau a évoqué le caractère crucial des interconnexions et du diamètre optimal de ces canalicules interconnectées⁸. Ces substituts osseux ne sont qu'ostéoconducteurs. Pour les rendre ostéo-inducteurs, il faut qu'ils puissent être équipés de cellules et/ou de facteurs de croissance.

LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMA-TEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE

Il est envisageable de fabriquer de l'os avec des cellules de moelle osseuse. Cependant il n'y a pas de consensus quant au nom donné à ces cellules issues de la moelle osseuse⁹. La dénomination retenue en français est « cellule souche mésenchymateuse » mais en anglais plusieurs termes sont retrouvés dans la littérature : mesenchymal stem cell (MSC), Bone marrow stem cell (BMSC)^{10,11}. Le problème de la dénomination de ces cellules est crucial car il cache mal deux problèmes principaux : celui du phénotype de ces cellules et celui de la nature des cellules obtenues en culture. Concernant le phénotype aucune molécule de surface n'a pu être identifiée comme spécifique de ces cellules permettant de les caractériser formellement^{12,13}. Concernant la nature cellulaire certains auteurs les considèrent comme des cellules souches à part entière d'autres comme des précurseurs cellulaires⁹. Il est donc difficile de comparer les travaux car il n'est pas certain que les auteurs parlent des mêmes cellules.

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse : définition

Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) de Moelle Osseuse (MO) sont des cellules multipotentes capables de se différencier vers les lignages ostéocytaires, chondrocytaires, stromocytaires et adipocytaires¹¹. Les CSM se caractérisent *in vitro* par leur capacité à générer des clones des « Unités Formant des Colonies de type fibroblastique » ou CFU-f. Comme l'a rappelé Frayssinet elles présentent d'autres caractéristiques : elles adhèrent au support de culture et peuvent être séparées par lavage, et stoppent leur prolifération par inhibition de contact. *In vitro* selon le milieu de culture elles vont présenter des voies de différenciation différentes, et il est possible d'orienter vers une voie préférentielle (ostéoblaste etc....) la différenciation des CSM. La plasticité de ces CSM est actuellement expliquée par 3 théories non exclusives qui peuvent être associées¹⁴ : La transdifférenciation (passage d'un état cellulaire à un autre), la persistance de CSM embryonnaire permettant à l'âge adulte la régénération tissulaire¹⁵, et la fusion cellulaire¹⁶.

Utilisation des CSM de MO chez l'animal

De nombreuses études animales ont démontré la possibilité d'obtenir du tissu osseux *in vivo*. Il existe 3 types d'études :

- des études sur le petit animal avec ossification ectopique (matrice céramiques chargées en CSM implantées en sous cutané dans les quadrants dorsaux),

- des études avec création et comblement de perte de substance d'os plat (crâne) avec évaluation d'une ossification intra membraneuse,

- des études avec création et comblement de perte de substance d'os long avec évaluation alors d'une ossification enchondrale.

Ossification Ectopique

Bareille rapportait en 2000 son expérience de mise en place en situation ectopique sous-cutanée de cylindres creux ensemencés par de la moelle osseuse humaine¹⁷. Les substituts ne présentaient aucune interconnexion, la moelle osseuse était prélevée chez des adultes de 20 à 40 ans. L'auteur estimait un volume de 10^7 de cellules de moelle osseuse par cylindre. A 1 semaine l'analyse du support ensemencé (HA de boeuf) montrait quelques cellules d'os humain ; à 2 semaines il existait une formation d'os lamellaire et à 6 semaines les auteurs notaient l'apparition d'os de souris. Cooper a rapporté son expérience de la mise en place de cylindres creux de 5 mm de long en sous-cutané chez les souris¹⁸. La porosité et la taille des pores n'étaient pas notées (céramique biphasée). Les auteurs laissaient incuber les cylindres dans 150 000 cellules pendant 3 H puis 2 jours dans du sérum albumine humain 37° ; ils observaient du tissu osseux dans 27 cas sur 29 de cylindres chargés en cellules.

Perte de substance du crâne

Krebsbach en 1998 rapportait son expérience du comblement de la perte de substance au niveau du crâne de 5 mm, comblé par une éponge en gélatine ensemencée de 3 à 5.10^6 de CSM¹⁹. A 2 semaines il observait la fermeture complète de la perte de substance, cependant la dure-mère n'était pas toujours conservée lors de la réalisation de cette perte de substance. Arnaud a rapporté son expérience en 1999 d'une perte de substance du crâne de 9 mm comblée par des granules de corail avec le comblement des pertes de substance quand les granules étaient chargés en moelle osseuse et en BMP (les auteurs ne précisaient pas quelle BMP)²⁰. La greffe de moelle était une allogreffe.

Perte de substance d'un os long

Bruder rapportait en 1998 son expérience de perte de substance du fémur de chien de 20 mm avec mise en place d'ostéosynthèse²¹. Les animaux avaient un appui à J8 et un cylindre creux de céramique biphasée était mis en place. Ces cylindres étaient ensemencés de cellules souches (autogreffe), les chiens étaient sacrifiés à 4-8-12 et 16 semaines. Les auteurs estimaient à 30.10^9 le nombre de cellules implantées. Les cylindres ayant été immergés dans 5 ml de sérum contenant $7,5.10^6$ CSM par ml et ce pendant 2 H. A 7 semaines, l'augmentation

de l'épaisseur de la reconstruction osseuse atteignant 1 mm à 4 semaines, 2 mm à 9 semaines et 2,5 mm à 12 semaines l'os néoformé comblant 40 % des pores. Les groupes contrôles sans substitut ne montraient aucune consolidation de la perte de substance ; dans le groupe contrôle avec un substitut, (une céramique sans CSM) aucune présence d'os n'était observée au niveau de la céramique sans disparition de celle-ci. Clément a rapporté son expérience du comblement de perte de substance de fémur de rat par des cylindres creux de 8 mm renforcés par une plaque en polyéthylène²². Les supports étaient une céramique en β TCP uniquement de porosité 54 %, une taille de pore variant de 250 et 500m. Ces cylindres étaient chargés de $1,2 \cdot 10^5$ de cellules par cm^2 de support. Les auteurs observaient pratiquement 50 % de colonisation osseuse à 2 semaines dans les supports chargés en cellules. Par la suite Petite²³ et Kon²⁴ ont à leur tour rapporté le comblement de défauts diaphysaires grâce à l'utilisation de cellules souches avec des substituts osseux variables en démontrant l'efficacité des CSM de MO.

L'importance du support et des conditions de culture

Dolder²⁵ a rapporté son expérience d'une perte de substance d'un diamètre de 8 mm comblée par des disques de titane de porosité 86 % avec des tailles de pores de 250, insérés en press fit ; les auteurs estimaient la quantité cellulaire à 570 000 cellules par disque. Ces disques en grillage de titane montraient au 30^{ème} jour de l'os formé au sein des pores, de la moelle osseuse et une union titane os. Dans le groupe titane seul, sans adjonction de cellules, les auteurs observaient 20 % d'os formé. Lennon rapportait l'importance d'une culture de cellules souches en atmosphère à pression partielle d'O₂ autour de 5 %²⁶. La pression partielle d'O₂ dans les vaisseaux atteint 70 mm hg mercure, la pression partielle d'O₂ dans la moelle osseuse atteint 21 à 49 mm hg, ce qui correspond à 4 à 7 % d'O₂. Dolder²⁷ a publié une expérience de moelle osseuse de rat et de BMP2 chargeant des supports en titane ; cet auteur n'a pas remarqué de différence dans le caractère rugueux ou non du support pour améliorer l'apparition d'os. Dans toutes ces études de nombreuses variables changent : le modèle animal, le support (céramique biphasée, HA pure, titane...) le nombre de cellules par unité de volume de support, la méthode d'amplification des cellules, les méthodes d'analyse de l'os formé (histo morpho métrie, mécanique, utilisation de synchrotron...).

Utilisation en orthopédie des CSM de la MO

Les deux principales sources de cellules ostéoprogénitrices sont représentées par le périoste et par les cellules de la moelle osseuse¹⁴. La destruction in vivo de ces 2 structures supprime donc toutes les cellules prédé-

terminées à se différencier en ostéoblaste et les facteurs ostéo inducteurs^{14,28}. Récemment Rumi a démontré sur un modèle d'ossification ectopique de hanche sur le lapin, que les cellules à l'origine de ces ossifications étaient bien issues du canal médullaire²⁹. En effet c'était l'irradiation préventive du canal médullaire et non celle de la hanche qui limitait la formation des ossifications. Le périoste peut lui aussi fournir des progéniteurs osseux ou cartilagineux^{30,31} mais avec une capacité moindre de différenciation que les cellules de la MO¹⁴. Plusieurs travaux cliniques ont montré la capacité de reconstruction osseuse grâce au périoste dont l'une des 2 couches, la couche interne au contact de l'os, contient ces cellules progénitrices³². L'utilisation du périoste est malgré tout rare en orthopédie. Si chez l'enfant son épaisseur fait sa considération, chez l'adulte il est réputé plus fragile et moins utilisable. Cependant les nouveaux implants fracturaires (plaques au design respectueux du périoste) permettent en le respectant d'obtenir des consolidations plus rapides³³. D'autres part, les systèmes d'enclouage des os longs porteurs sont des preuves indirectes que le respect du périoste n'est pas négligeable. Enfin des lambeaux ostéo périostés sont utilisés depuis longtemps pour la cure de pseudarthrose de scaphoïde³⁴. Ainsi en pratique clinique « l'utilisation de CSM en orthopédie » correspond à ce jour à utiliser de la moelle osseuse (MO).

Utilisation des CSM de MO sans expansion

L'avantage de l'utilisation de moelle osseuse sans expansion est évidemment sa simplicité et la possibilité de réinjecter la moelle dans le même temps opératoire au niveau du site osseux à combler. Cette simplicité va de pair avec un coût minime même si un matériel spécifique peut être nécessaire. Le vrai problème de cette technique simple est bien l'impossibilité de connaître la qualité et la quantité de CSM effectivement injectées. Muschler a montré qu'il existait 32 millions de cellules mononuclées par millilitre de moelle osseuse ; mais il n'existerait qu'une CSM sur 18 000 de ces cellules mononuclées. Ainsi seuls quelques milliers de CSM peuvent être injectés après aspiration de 2 à 4 ml de moelle. Muschler recommande d'aspirer la moelle osseuse en plusieurs fois, sur plusieurs sites avec aspiration de 2ml à chaque fois^{35,36}. En effet l'aspiration récurre surtout des éléments hématopoïétiques. Ainsi comme le rappelle Lucarelli, sans expansion, il est illusoire d'injecter autre chose qu'une quantité minime de CSM noyées dans une « soupe » d'éléments hématopoïétiques⁹. Par ailleurs cet auteur souligne la difficulté d'avoir un contrôle négatif en cas d'étude comparative : il n'existe pas d'anticorps spécifique !

Utilisation des CSM de MO avec expansion

Le but de l'expansion est bien d'augmenter le nombre des CSM disponible. L'expansion des CSM consiste à placer le produit d'aspiration dans un milieu de culture statique ou dans un bio réacteur. Selon la technique et le milieu, un nombre significatif de CSM peut être obtenu en quelques jours ou semaines³⁷. Un autre avantage est la possibilité de faire exprimer à ces cellules une protéine inductrice telle que les BMP^{38,39}. Il est même probable que dans les années à venir l'obtention de CSM pourra être réalisée à partir de tissu graisseux. Les inconvénients de l'expansion sont en premier lieu le coût. Par ailleurs les techniques d'expansion ne reposent pas toutes sur les mêmes principes : certaines sélectionnent les CSM par adhérence⁴⁰, d'autres le font par utilisation d'anticorps spécifiques. Même si ces 2 techniques permettent d'obtenir des CSM à l'origine de lignées ostéogénique, il n'est pas certain que les CSM sélectionnées le soient au même stade. Un autre inconvénient de l'expansion est le temps nécessaire (3 à 6 semaines) obligeant l'opérateur et le patient à 2 procédures. Enfin l'expansion est à l'origine d'une perte de potentiel des CSM⁴¹. C'est pour cette raison que plusieurs auteurs cherchent à sélectionner directement la fraction cellulaire de la MO concentrant le potentiel ostéogénique⁴².

L'expérience clinique d'utilisation de Moelle osseuse ou de CSM

Plusieurs séries de pseudarthroses traitées par stabilisation et injection percutanée de moelle osseuse ont été rapportées avec support céramique ou non^{43,49}. Les résultats de ces études plaident en faveur de l'injection de moelle. Récemment Goel a rapporté 20 cas d'injection sous anesthésie locale de 5 ml de MO prélevée au niveau de la crête iliaque avec 75% de consolidation⁴⁹. Cette étude n'est pas exempte de critiques (petits effectifs, type de pseudarthrose, pas de groupe contrôle, évaluation radiographique et pas scannographique etc...) mais elle souligne la simplicité de la technique : Connolly^{45,46} injectait 150 ml de MO, Goel en a injecté dix fois moins ! Hernigou a montré l'importance du nombre de « progéniteurs » injectés dans l'obtention de la consolidation⁵⁰. L'utilisation de CSM avec expansion a été réalisée pour la première fois par Bruder sur le chien²¹. Par la suite Petite²³ et Kon²⁴ ont publié des travaux démontrant la supériorité de l'utilisation de CSM de moelle osseuse dans le comblement de pertes de substance des os longs chez l'animal. Une seule étude humaine a été rapportée avec utilisation de CSM de MO après expansion chez l'homme dans des cas de pseudarthrose d'os longs⁵¹. Au-delà du problème éthique posé par ces cas, il existe à notre avis une critique essentielle : celui de l'évaluation de la consolidation des pertes

de substance diaphysaire des 3 cas publiés. En effet le support utilisé était une hydroxyapatite pure. Dès sa mise en place ce substitut est dense et l'évaluation radiographique est incapable de démontrer une modification ou une évolution de la repousse osseuse au sein du matériau. Les auteurs fixent la « consolidation » à 6 mois environ de l'intervention. Comment font ils ? ...

LES PROTEINES INDUCTRICES OSSEUSES : BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (BMP)

Effet in vitro

Les BMP appartiennent à la superfamille des TGF Bêta. Les BMP humaines 2 et 4 ont été clonées pour la première fois en 1988. Aujourd'hui, plus de 20 BMP ont été identifiées. Les BMP 2, 4, 6, 7 et 9 ont montré des capacités d'induction osseuse^{52,53}. In vitro, les BMP augmentent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en ostéoblastes². Les BMP peuvent induire la formation d'os à partir de CSM indifférenciées, mais aussi à partir de fibroblastes et de myoblastes¹. Seules les BMP2 (Inductos[®]) et BMP7 (Osigraft[®]) sont commercialisées et donc utilisables en clinique, en France. Elles sont maintenant remboursées dans le cadre de leurs indications respectives (BMP2 et fractures ouvertes de jambe, BMP 7 et pseudarthrose résistante du tibia). La BMP2 agit plus en amont que la BMP7 sur la différenciation cellulaire. La BMP2 a une action sur le recrutement cellulaire global (J+1 à 3), tandis que la BMP7 agit sur la différenciation osseuse (J+2 à 5)^{54,55}. La BMP2 induit ou augmente l'expression des marqueurs du phénotype ostéoblastique en culture de cellules multipotentes (stromales, fibroblastes, myoblastes). La BMP2 induit la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en cellules plus matures (ostéoblastes), mais aussi en inhibant la différenciation vers la voie musculaire⁵⁶. Par ailleurs, les ostéoblastes les moins différenciés, présents au sein de groupes cellulaires dérivant de la moelle osseuse, répondraient mieux à la BMP2⁵⁷. A l'état naturel, il existerait 1 à 2 microgrammes de BMP par kilogramme d'os cortical⁵⁸. On ne pourrait extraire que 0,1 microgramme de BMP par kilogramme d'os⁵⁹. L'action des BMP est dose dépendante. L'initiation de la différenciation vers la lignée ostéoblastique est maximale quand les concentrations de BMP atteignent 1 à 10 nmole par litre⁶⁰. La BMP2 à 1,5 microgramme par ml stimule les ostéoblastes en culture (augmentation de l'activité phosphatase alcaline), mais pas en contact direct avec les biomatériaux⁶¹. In vitro, seulement 2 microgrammes de BMP2 associés à du collagène et de l'hydroxyapatite induisent de l'os dans les pores profonds⁶². Oda a montré que la BMP2 associée à un support de Bêta TCP en sous-cutané chez le rat induisait une formation d'os avec des doses

de 50 microgrammes, mais pas avec des doses de 2 microgrammes⁶³.

Les supports nécessaires aux BMP

Deux types de support sont nécessaires pour la reconstitution osseuse en cas d'utilisation de BMP :

- une matrice pour la BMP en elle-même,
- un support pour le futur os néoformé.

Ces deux types de support peuvent ne faire qu'un. Le facteur critique pour la reconstitution osseuse lors d'utilisation de BMP est la présence de matrice extracellulaire. (Les implantations les plus réussies de BMP ont été chaque fois qu'un support matriciel a été utilisé). Le collagène ou les polymères synthétiques résorbables semblent constituer ce groupe de support matriciel stimulant idéal⁵⁴. Le collagène stimule la croissance des cellules et contrôle la mobilité cellulaire⁶⁴. Mais selon le type de collagène utilisé, celui-ci peut gêner la formation du cal⁶⁵.

Le collagène

Les formes de collagène qui ont montré une efficacité dans l'induction ostéo cartilagineuse sont les collagènes 1 et 4 en "covalent binding" ou un mélange de collagène 4. L'association la plus efficace selon Gao serait un mélange de 1 à 2,5 mg de BMP associé à du collagène 4⁶⁶.

Importance de la porosité du support

La quantité d'os néoformé dépend du volume de biomatériau plus que de la quantité de BMP selon Sampath⁶⁷. La porosité optimale du biomatériau support serait de 300 à 400 microns⁶⁸. Les supports d'hydroxyapatite avec des pores entre 9 et 200 microns produisent de l'os plus rapidement qu'avec des pores plus gros⁶⁹. Les supports d'hydroxyapatite avec des pores entre 30 et 400 microns montrent les plus importantes élévations en concentration et en phosphatases alcalines et en ostéocalcin, significatives d'ostéogénèse⁷⁰. L'inter-connexion du support semble être un paramètre important. Lors d'une expérience d'ostéo conduction avec l'hydroxyapatite, la taille minimale de l'interconnexion des pores était de 100 microns pour l'os minéralisé, de 40 à 100 microns pour le tissu ostéoïde, de 5 à 15 microns pour le tissu fibreux⁷¹. Gao propose ainsi l'association idéale d'une céramique, de collagène 4 et de BMP⁶⁶.

Echec de l'utilisation des BMP

Il existe plusieurs publications où l'utilisation de BMP et de support n'entraîne pas la formation d'os. Glass ne retrouve aucune formation d'os lors d'utilisation de BMP sur un support hydroxyapatite en ectopique chez le rat (dose et volume ?)⁷². Jeppsson a montré que

la BMP2 inhibait la formation d'os quand on l'ajoutait à une éponge de collagène dans des chambres de titane chez le lapin⁷³. Aspenberg lui aussi a publié l'absence de formation d'os lors d'utilisation de BMP sur un support⁷⁴. La notice de la BMP2 commercialisée en France (Inductos[®]) rappelle la possibilité d'une résorption osseuse en cas d'utilisation en site métaphysaire.

L'efficacité des BMP chez l'animal

De nombreuses études animales ont montré l'efficacité des BMP dans l'apparition d'une ossification dans les pertes de substance osseuse tant en situation ectopique, que lors de réalisation de pertes de substance au niveau des os plats (crâne) que lors des pertes de substance des os longs des animaux⁷⁵. Toutes ces expériences animales montrent que l'effet est dose dépendant et qu'il existe une variabilité dans la réponse et dans l'importance de la reconstruction osseuse selon les espèces⁷⁵. En effet, récemment Seeherman a montré la reconstruction, le comblement d'une perte de substance d'un os long chez l'animal avec l'association d'un support de céramique et d'une BMP recombinante⁷⁶. Chen a rapporté le comblement d'un défaut osseux fémoral chez le rat avec l'utilisation de BMP en milieu septique⁷⁷. Puisque de nombreuses études ont pu démontrer que les BMP étaient sûres et efficaces chez l'animal, comment ou pourquoi ne pas espérer obtenir les mêmes résultats chez l'homme ?

Les BMP sont-elles sûres ?

Il existe de nombreux tissus qui possèdent des récepteurs aux BMP et non des moindres. En effet, si l'on retrouve un certain nombre de tissus ectodermiques qui possèdent des récepteurs aux BMP et notamment à la BMP7, il existe aussi des tumeurs comme les ostéosarcomes, les chondrosarcomes, les tératocarcinomes qui possèdent ces récepteurs⁷⁸. Cependant, aucune évolution maligne n'a été rapportée quant à l'utilisation de la BMP7 ou des autres BMP en clinique. Les travaux cliniques récents de Capanna confirment les études déjà publiées quant à l'absence d'apparition tumorale⁷⁹. Chiron rappelle que par ailleurs, ces BMP étaient en mesure d'inhiber un certain nombre de tumeurs (sein, rein, poumon)⁵⁵. En ce qui concerne le lien entre tumeurs et BMP il est possible à ce jour d'écrire 2 faits :

1) il n'y a pas de cas publié rapportant la survenue d'une tumeur dans les suites de l'utilisation d'une BMP en reconstruction des os longs (l'existence d'une tumeur présente ou passée chez un patient doit d'ailleurs faire contre-indiquer l'utilisation de BMP)

2) il existe une littérature fondamentale abondante concernant les liens entre BMP et cancer dans le sens de l'inhibition tumorale⁸⁰, comme dans le sens de la promo-

tion⁸¹. Comment pourrait il en être autrement dans la mesure où les BMP sont des facteurs de croissance ubiquitaire ?

Il existe par contre des effets secondaires mineurs comme des maux de tête, une augmentation de l'amylasémie sans pancréatite, une diminution du magnésium, des tachycardies rapportées avec la BMP2. Par ailleurs, il existe des effets paradoxaux au niveau osseux; en effet, Chiron a bien montré l'apparition de lyse osseuse en zone métaphysaire en cas d'injection à ce niveau de BMP2⁵⁵. Ces effets paradoxaux ont des explications ... encore inconnues mais il ne serait pas improbables que ces facteurs de croissance puissent stimuler de la même façon les lignées ostéoclastiques. Concernant les effets indésirables locaux (réactions inflammatoires, douleur) il n'est pas toujours facile de les rapporter aux BMP au vu des lésions (fractures ouvertes – pseudarthroses), et au vu de leur traitement (ostéosynthèse à ciel ouvert avec ou sans greffe associée). Il existe logiquement la possibilité d'ossification ou de calcification ectopique. L'apparition d'anticorps antiBMP ou d'anticorps anti-collagène a été décrite mais chez moins de 5 % de la population.

Les BMP sont-elles efficaces chez l'homme ?

Au vu des résultats chez l'animal montrant des reconstitutions osseuses, il est logique de se poser la question. Geezing a bien montré sur un modèle de perte de substance osseuse de la fibula chez l'humain variant de 13 à 16 mm qu'il était possible d'obtenir un comblement de la perte de substance osseuse grâce à l'utilisation de Demineralized Bone Matrix (DBM) ou de BMP7⁸². Cet auteur rapporte la comparaison de 4 groupes de 6 patients ayant bénéficié d'ostéotomie du tibia lors de laquelle une ostéotomie du péroné est nécessaire selon la technique employée. Le groupe contrôle ou le groupe de patients avec comblement de la perte de substance du péroné par un support collagène n'ont montré aucune consolidation. Les groupes avec adjonction de DBM ou de BMP7 ont montré une consolidation. Il n'existait qu'un cas avec de la BMP7 où il n'existait pas de comblement osseux mais chez un patient avec anticorps antiBMP7. L'auteur posait la question d'une relation car il n'est pas certain que la présence d'anticorps permette d'expliquer l'absence d'ossification. Cette étude randomisée est la première montrant un comblement osseux diaphysaire chez l'homme avec de la BMP. Mais il ne s'agissait pas d'une pseudarthrose avec dévascularisation locorégionale. En fait, la vraie question est de savoir si les BMP utilisées en clinique sont efficaces et permettent l'apparition d'os en cas de pseudarthrose. En effet, toutes les études animales ou même l'étude humaine ont montré l'ossification dans des zones où la perte de substance était surve-

nue en tissu sain non infecté, en terrain non tabagique et non multi opéré. C'est toute la différence avec les pseudarthroses en clinique avec ou sans perte de substance osseuse. Concernant l'utilisation de DBM en clinique, il s'agit d'allogreffe qui conserve le potentiel d'ostéo induction puisque les échantillons contiennent plusieurs types de BMP. Cependant l'âge des donneurs (souvent proche de 80 ans) et la grande variabilité des doses des différentes BMP contenues dans un même échantillon peuvent rendre l'analyse des résultats (bons ou mauvais) difficile et mal prévisible⁸³.

Séries cliniques publiées

En ce qui concerne les travaux publiés sur les pseudarthroses avec utilisation de BMP, il existe peu de séries et surtout des cas difficilement comparables. Deux types de travaux existent :

Premier groupe de travaux : Ce sont des séries ou des cas isolés de pseudarthrose surtout du tibia ou du fémur, non solutionnés par une ou deux opérations ; ce sont des cas avec une perte de substance osseuse importante ou bien des pseudarthroses serrées et des pertes de substance inférieures à 1 cm. Mais souvent il est difficile de séparer les cas avec perte de substance osseuse et ceux sans perte de substance. Par ailleurs, il existe des cas où l'adjonction de BMP représente la dernière chance avant l'amputation. Il n'y a jamais de groupes contrôles.

Il existe deux principales difficultés méthodologiques pour analyser ces travaux ; lors de la prise en charge thérapeutique, l'adjonction de BMP n'est pas isolée et donc, il est difficile d'accorder à la BMP la réussite éventuelle. En effet, bien souvent un support est ajouté, de l'autogreffe ou de l'allogreffe. Par ailleurs, il est très difficile, quand il n'existe pas de réelle perte de substance osseuse, de savoir comment analyser l'évolution de la consolidation osseuse grâce à des radiographies. L'analyse par scanner aurait permis de lever le doute.

Le deuxième groupe de travaux regroupe des essais comparatifs randomisés.

1er groupe de travaux : les pseudarthroses avec ou sans perte de substance osseuse résistante.

Dans tous les cas rapportés même s'ils ne sont pas comparables, les auteurs insistent sur plusieurs points clés : une fixation stable et une couverture des parties molles sont nécessaires. La BMP était toujours associée avec le support osseux ou synthétique; le support avec la BMP était toujours intercalé dans la zone de résection de la pseudarthrose. Bien évidemment, dans ces séries certains cas étaient septiques ou secondaires à des fractures ouvertes. Ce qu'il est difficile de savoir dans tous

ces travaux c'est si la BMP mise en place était en contact avec l'os sain, si l'os était saignant et si un drainage avait été mis en place. Plusieurs études sont représentatives de cette famille de travaux de perte de substance résistante au traitement avec ou sans perte de substance^{84,87}. Il existe de rares cas où l'adjonction ou l'injection de BMP constitue la dernière chance avant l'amputation. C'est la philosophie avec laquelle a été réalisé le travail de l'équipe Lilloise rapportée par Chiron de 6 cas qui ont tous consolidé en six mois, ayant tous été infectés⁵⁵. Tous les travaux publiés sur la pseudarthrose ont été réalisés avec la BMP7 ; il n'y a pas encore de publications chez l'homme concernant la BMP2 et la pseudarthrose. Il existe par ailleurs des cas où la pseudarthrose ne pourra pas correctement évoluer car la perte de substance est trop importante (supérieure à 10 cm). Comme nous plusieurs équipes utilisent la technique de membrane auto induite avec adjonction de BMP7 dont les résultats sont en cours d'évaluation.

L'une concerne les fractures de jambe ouvertes avec adjonction de BMP2 (88) et l'autre concerne les pseudarthroses du tibia traitées par BMP7 (89). Ces deux études randomisées ne montrent pas de supériorité de l'adjonction de BMP tant dans la fracture que dans la pseudarthrose sur des techniques classiques d'enclouage pour la fracture ou d'autogreffe pour la pseudarthrose. Cependant, en ce qui concerne l'étude des fractures un sous groupe avec utilisation de BMP2 obtenait les mêmes résultats qu'avec alésage de la fracture. En ce qui concerne l'étude des pseudarthroses comparant autogreffe et BMP7, le groupe BMP présentait des critères péjoratifs (plus de perte de substance, plus de patients tabagiques). Si ces deux études ne montrent pas de supériorité elles montrent une capacité des BMP à égaler l'autogreffe et surtout dans les groupes BMP de ces 2 études il existait significativement moins de sepsis post opératoire. Ce qu'il faut remarquer c'est que dans tous les travaux non comparatifs, l'adjonction de BMP a amené pour quasiment tous les cas, dans la limite de l'analyse d'une publication, l'arrêt des procédures thérapeutiques et la conservation du membre.

NOTRE EXPERIENCE :

Appariement de cas de pseudarthrose traités avec et sans BMP7 (Osigraft®)

L'objectif de ce travail était de savoir si l'adjonction d'Osigraft®, en plus des autres moyens classiques de prise en charge d'une pseudarthrose d'un os long permettrait d'obtenir une consolidation plus rapide.

Matériel et Méthode

Le critère d'inclusion était une pseudarthrose des os longs, évoluant au moins depuis plus de 9 mois, ne consolidant pas après une première cure (alésage itératif, greffe osseuse). Tous les patients ont été revus au plus grand recul par un évaluateur indépendant. La consolidation « clinique » a été définie par l'existence de l'indolence sur le membre où siégeait la pseudarthrose avec absence de mobilité ou de douleur provoquée lors de la mobilisation du foyer. La consolidation « radiologique » a été définie par l'existence d'une continuité de deux corticales dans chaque plan et dans deux plans orthogonaux obtenus par examen radiographique ou par examen scannographique si les radiographies ne permettaient pas d'être formel. Chaque cas de pseudarthrose inclus a été rétrospectivement apparié avec une pseudarthrose du même os, de la même tranche d'âge, avec une perte de substance de la même importance avec un sepsis ou non. Ainsi, ont été incluses :

Deux pseudarthroses de l'humérus, aseptiques, sans perte de substance, dans une tranche d'âge de 30 - 40 ans, ostéosynthésées initialement par plaque ; 2 pseudarthroses aseptiques du fémur, sans perte de substance, dans une tranche d'âge de 20 - 30 ans, ostéosynthésées initialement par clou ; 2 pseudarthroses septiques du tibia avec perte de substance d'au moins 30 % du segment jambier, dans une tranche d'âge 40 - 50 ans, avec plusieurs types d'ostéosynthèse ; 2 pseudarthroses aseptiques du tibia au niveau du 1/3 distal, sans perte de substance, chez des patients de 20 - 30 ans. Dans les cas traités et inclus dans ce travail, les tissus septiques ou nécrotiques étaient réséqués, la reperméabilisation des canaux médullaires et la décortication étaient réalisées dans tous les cas. La fixation lors de l'évaluation pré-opératoire et per opératoire, était modifiée si nécessaire quitte à la reconsidérer dans son ensemble (ajout d'une deuxième plaque, ajout d'une plaque à un clou, ablation d'un clou et remplacement par une plaque...). La greffe osseuse, inévitable en cas de perte de substance, était réalisée en fonction des conditions locales per opératoires. La mise en place de l'Osigraft® intervenait donc en dernier lieu, avant la fermeture, mélangé avec du sang ou de la moelle osseuse afin d'obtenir un mélange sable humide, l'Osigraft® se présentant sous la forme d'une poudre. Cette consistance de sable humide, peu liquide, permettait sa mise en place idéalement au contact os vivant - greffe. Il est logique de ne pas drainer pour éviter la perte du produit.

Résultats (Tableau I , Fig. 1 à 3)

Si l'âge était similaire dans les 2 groupes, la durée d'évolution de la pseudarthrose était plus longue dans le groupe sans Osigraft® mais la consommation de tabac

était plus importante dans le groupe Osigraft®. Si le nombre de jours d'hospitalisation (40 jours), le nombre d'intervention (4 interventions) étaient similaires dans les 2 groupes, les patients consultaient moins dans le groupe Osigraft® (un tiers de consultation en moins). La durée de consolidation était deux fois plus rapide dans le groupe Osigraft®. La durée d'arrêt de travail était deux fois moins longue dans ce même groupe mais seuls 2 patients travaillaient dans le groupe sans Osigraft®. La technique de reconstruction selon la technique de Masquelet, avec ou sans utilisation d'Osigraft®, a, dans les 2 cas, été suivie de l'arrêt du sepsis. L'adjonction d'Osigraft® était suivie de la consolidation et de l'arrêt des procédures si la fixation était restée stable tout au long de la prise en charge, quitte à ce que celle-ci soit modifiée. Dans le cas de la pseudarthrose fémorale du groupe Osigraft® il y a eu une erreur technique : l'adjonction d'Osigraft a été suivie d'une autre intervention car la fixation alors instable n'a pas été modifiée, avec 5 jours d'hospitalisation et 4 jours de consultation en plus. L'erreur technique réside dans la non reconsidération de l'ostéosynthèse. Ce travail est rétrospectif et s'expose aux critiques de ce type d'étude. Les échantillons sont très petits. Cependant, c'est le premier avec appariement de cas qui compare ce qui semble comparable. Il n'y a pas non plus de certitude sur le lieu idéal de mise en place de l'ostéoinducteur en cas de perte de substance osseuse (en contact avec les extrémités osseuses ? mélangé à la greffe osseuse ?). Un autre problème est celui de l'évaluation de la consolidation et nous avons dû utiliser le scanner qui affine l'analyse radiographique et n'est pas gêné par le matériel pour évaluer la continuité des corticales.

CONCLUSION

Les orthopédistes ou les lecteurs pressés ont cru, un instant, avec l'arrivée sur le marché des inducteurs osseux que le problème des pseudarthroses diaphysaires était réglé. En effet, ils ont extrapolé les études animales à leurs futurs patients. Mais bien souvent, les animaux présentent un os sain, ils ont rarement été multi opérés et ils ne fument pas (pas encore !). Par ailleurs, les lecteurs n'ont pas regardé les délais de consolidation qui se comptent toujours en mois. Et même sur les défauts osseux sur os sain, la consolidation est acquise en un an. Nous en arrivons aujourd'hui à imaginer que la première intervention pour pseudarthrose d'un os long puisse être la dernière. Avec la possibilité d'utiliser des cellules ou des protéines inductrices, il faut prendre le temps d'analyser précisément les échecs et les consolidations obtenues en essayant de rendre à chaque acteur de la consolidation osseuse sa responsabilité³⁰. Il faut aussi respecter les principes connus mais parfois oubliés de la prise

en charge des pseudarthroses des os longs. La rigueur est plus que jamais nécessaire dans l'élaboration et l'évaluation de nos futurs travaux.

	avec Osigraft®	sans Osigraft®
Avant la cure de pseudarthrose		
Age (ans)	38 (30- 42)	37,5 (26 -49)
tabac (paquets /année)	18,5 (12-26)	11 (10-18)
délai de prise en charge	20,5 (9-33)	34 (9-64)
Après la cure de pseudarthrose		
N jours hospitalisation	42 (4-141)	44,25 (9-114)
N jours consultation	12,75 (8-14)	18,75 (11-30)
N opération	4,25 (1-8)	4,5 (2-8)
durée AT	14,75 (3-26)	34,5 (27-42)
délai consolidation (mois)	24,5 (13-41)	47,75 (25-66)

Tab I : Facteurs de risque de pseudarthrose

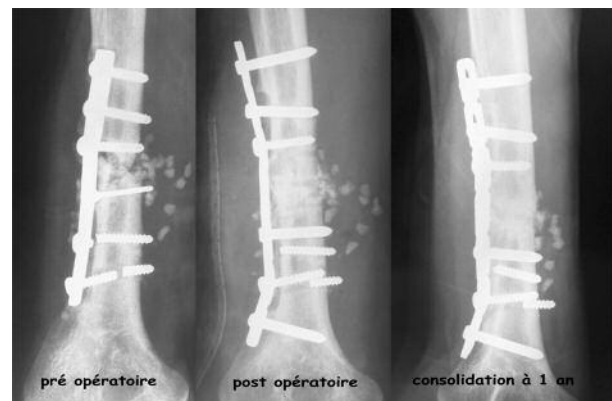


Fig. 1 : Patient de 42 ans présentant une pseudarthrose de l'humérus (avec paralysie radiale initiale résolutive) après ostéosynthèse par plaque... Mise en place d'une ostéosynthèse par plaque LCP® 4,5 et adjonction d'Osigraft®. Consolidation acquise en un an.

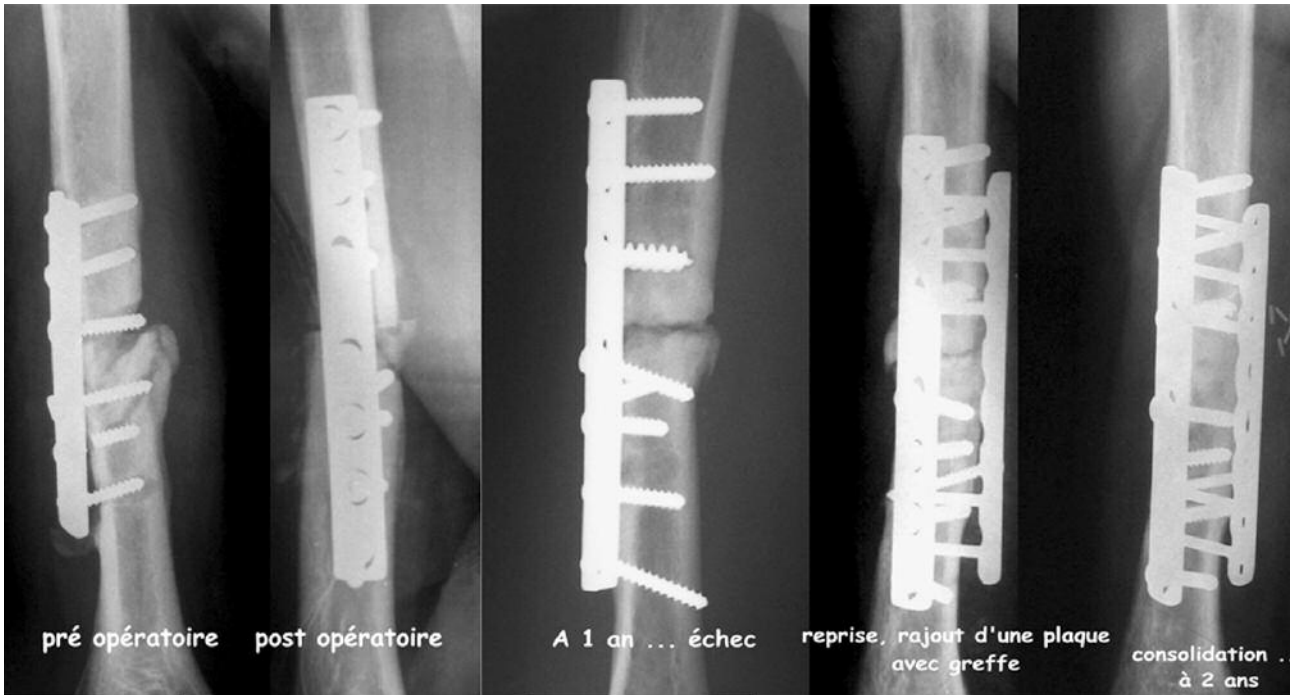


Fig. 2 : Patiente de 43 ans présentant une pseudarthrose de l'humérus quasiment identique à la précédente en terme d'aspect et de prise en charge (avec paralysie radiale initiale résolutive). Une reprise par ostéosynthèse par plaque est réalisée, mais à un an, la consolidation n'est pas acquise. Le montage est peut-être critiquable, mais il n'y a pas de lyse autour des vis. Une nouvelle ostéosynthèse est réalisée, associée à une décortication et une greffe. La consolidation est acquise au bout de 2 ans.

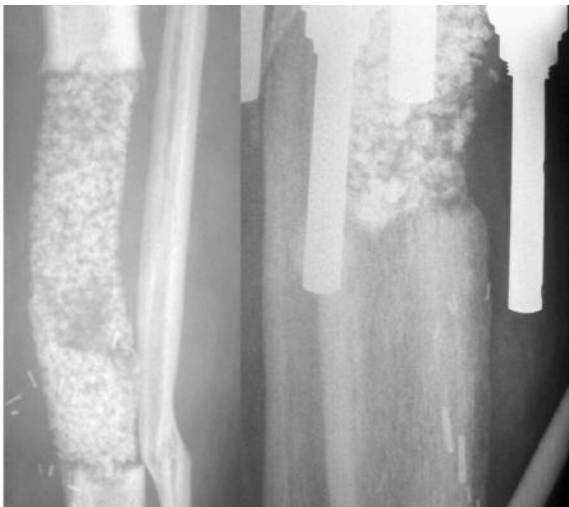


Figure 3 : Comparaison de 2 cas de techniques de membrane induite (Technique de Masquelet) au niveau du tibia avec utilisation de céramique biphasée. A gauche, à un an, il n'y a pas d'os formé à la jonction os sain – manchon de substitut. A droite, à 6 mois, on observe avec l'utilisation de BMP7 une zone jonctionnelle dont l'ossification est plus avancée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Ripamonti U, Tasker JR. Bone induction by TGF bêta in the primary and synergistic interaction with BMP In *Advances in skeletal reconstruction using bone morphogenetic proteins* édité par t lindholm world scientific 2002 : 79-95
- 2 Reddy AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop* 1998; 355S : 66-72
- 3 Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Ann Chir Plast Esthet* 2000, 45: 346-353
- 4 Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J Induced membrane secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate regeneration. *J Orthop Res* 2004, 22: 73-79
- 5 Viateau V, Guillemin G, Calando Y, Oudina K, Sedel L, Hannouche D, Petite H. Reconstruction de perte de substance osseuse massive par la procédure de Masquelet : modèle expérimental chez la brebis. *Rev Chir Orthop Ap Loc* 2005 ; 6:3S83-84
- 6 Gupta AR and Coll. Perioperative and long term complications of iliac crest bone graft harvesting for spinal surgery: A quantitative review of the literature. *International Medical Journal* 2001; 8:163-66
- 7 Ochner PE. Ostéogénèse et ostéosynthèse - Conférence d'enseignement de la SOFCOT. In *Expansion Scientifique Paris* 1999, 70; 1-18
- 8 Chouteau J, Bignon A, Chavassieux P, Chevalier J, Melin M, Fantozzi G, Boivin G, Harthmann D, Carret JP. Incipient analysis of mesenchymal cell derived osteogenesis. *Rev Chir Orthop* 2003, 89; 44-52
- 9 Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfusion and Apheresis Science* 2004 ; 301: 169 -174
- 10 Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.
- 11 Bianco P, Robey GP. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000;105:1663-8.
- 12 Simmons PJ, Gronthos S. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 1994;389:271-80.
- 13 Barry F, Boynton R. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289:519-24.
- 14 Frayssinet P, Guichet JM. Aspects cellulaires de la régénération osseuse : rôle du périoste et de la moelle osseuse. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2004; 90 :765-70
- 15 Jiang Y, Jahagirdar BN. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893):41-9.
- 16 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med*, 2000; 6: 1212-3.
- 17 Bareille R, Lafage-Proust MH, Fauchoux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amedee J. Various evaluation of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials* 2000, 21; 1345-1352
- 18 Cooper LF, Harris CT, Bruder SP, Kowalski R, Kadiyala S. Incipient analysis of mesenchymal cell derived osteogenesis. *J Dent Res* 2001, 80; 314-320
- 19 Krebsbach Ph, Mankani Mh, Satomura K, Kuznetsov Sa, Robey Pg. Repair of craniotomy defects using bone marrow stroma cells. *Transplantation* 1998,66; 1272-1278
- 20 Arnaud E, Pollak Cd, Meunier A, Sedel L, Damien C, Petite H. Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty. *Biomaterials* 1999, 20; 1909-1918
- 21 Bruder Sp, Kraus Kh, Goldberg Vm, Kadiyala. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone and Joint Surg* 1998,80; 985-996
- 22 Clement D, Le Huec Jc, Naji A, Foliguet B, Harmand Mf. Potentiel ostéogénique de cultures de cellules issues du stroma de la moelle osseuse sur un support de phosphate tricalcique chez le rat. *Actualités en biomatériaux* 2002,6; 319-327
- 23 Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18: 959-63.
- 24 Kon E, Muraglia A, Corsi A. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000;49 :328-37.
- 25 Dolder Jvd, Farber E, Spauwen Phm, Jansen Ja. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stroma cells. *Biomaterials* 2003, 24; 1745-1750
- 26 Lennon Dd, Edmison Jm, Caplan Ai. Cultivation of rat marrow derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension : effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* 2001,187; 345-355
- 27 Dolder Jvd, Ruijter Ajad, Spauwen Phm, Jansen Ja. Observations on the effect of BMP-2 on rat bone marrow cells cultured on titanium substrates of different roughness. *Biomaterials* 2003, 24; 1853-1860
- 28 Rauch F, Lauzier D, Croteau S, Travers R, Glorieux FH, Hamdy R Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2000; 26: 611-17.
- 29 Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pellegrini VD Jr. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res*. 2005; 23:34-40.
- 30 Davis CM, Miura Y, Sarkar G, Bolander ME, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW Expression of cartilage-specific genes during neo-chondrogenesis in periosteal explants. *Biomedical Research* 2000 ; 21 : 9-15.
- 31 Bahrami S, Stratmann U, Wiesmann HP, Mokryk K, Bruckner P, Szuwart T Periosteally derived osteoblast-like cells differentiate into chondrocytes in suspension culture in agarose. *Anatom Record* 2000; 259: 124-130.
- 32 Lapierre F, Masquelet AC, Aesch B, Romana C, Goga D. Cranioplasties utilisant un lambeau libre ostéo périosté fémoral *Chirurgie*. 1991;117: 293-6
- 33 Wagner M, Frenk A, Frigg R. New concepts for bone fracture treatment and the Locking Compression Plate. *Surg Technol Int*. 2004;12: 271-7.

- 34 Malizos KN, Dailiana ZH, Kirou M, Vragalas V, Xenakis TA, Soucacos PN. Longstanding nonunions of scaphoid fractures with bone loss: successful reconstruction with vascularized bone grafts. *J Hand Surg.* 2001;26B:330-4.
- 35 Muschler GF, Nitto H. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 2001;19:117-25.
- 36 Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1699-709.
- 37 Lucarelli E, Beccheroni A. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003;24:3095-100.
- 38 Caplan AI. Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clin Orthop* 2000; 379: S67-70.
- 39 Turgeman G, Pittman DD. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med* 2001;3:240-51.
- 40 Friedenstien AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:263-72.
- 41 Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* 2000;28:707-15.
- 42 Deschaseaux F, Gindraux F., Saadi R., Obert L., Chalmers D., Herve P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal cells using an anti CD49a antibody reveals their CD45med low phenotype. *Br J Haematol* 2003; 122: 506-517
- 43 Connolly JF, Guse R. Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. *J Orthop Trauma* 1989;3(4):276-82.
- 44 Healey JH, Zimmerman PA. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop* 1990;(256):280-5.
- 45 Tiedeman JJ, Connolly JF. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin Orthop* 1991; 268: 294-302.
- 46 Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop* 1995; 313:8-18.
- 47 Wilkins RM, Chimenti BT, Rifkin RM. Percutaneous treatment of long bone nonunions: the use of autologous bone marrow and allograft bone matrix. *Orthopedics* 2003; 26: S549-54.
- 48 Matsuda Y, Sakayama K. Percutaneous autologous bone marrow transplantation for nonunion of the femur. *Nippon Geka Hokan* 1998;67:10-7.
- 49 Goel A, Sangwan S.S, Siwach R.C, Ali A.M. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union Injury. *Int. J. Care Injured* 2005; 36: 203-206
- 50 Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg.* 2005;87A:1430-7
- 51 Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov S, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N England J Med* 2001; 344: 385-386
- 52 Celeste AJ, Song JJ, Cox K, Rosen V, Wozney JM. Bone morphogenetic protein 9, a new member of the TGF beta superfamily. *J Bone Miner Res* 1994; 9: S137
- 53 Gitelman SE, Kobrin MS, Ye JQ, Lopez AR, Lee A, Derynck R, Recombinant Vgr-1/BMP6 expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. *Cell Biol* 1994; 126: 1595
- 54 Matthews S. Different characteristics of BMP family. 1st European clinical symposium molecular aspects of bone healing Leeds 2004
- 55 Chiron P. Protéines inductrices de l'os. Conférence d'enseignement de la SOFCOT Elsevier Paris 2004 : 271-291
- 56 Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney Jm, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 1991; 113: 681-87
- 57 Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies, and implant fixation . *Acta Orthop Scand* 1998; 283S; 2-37
- 58 Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman Jr. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop.* 1996 ;324:39-46.
- 59 Wikesjo UM, Xiroupaidis AV, Thomson RC, Cook Ad, Selvig KA, Hardwick W. Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 2003 ;30:705-14.
- 60 Reddi AH. Bone morphogenetic proteins : An unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8:11
- 61 Lewandoska M, Szumiel G Benke. Influence of inorganic biomaterials on rhBMP-2 effectiveness in osteoblast culture. In *Advances in skeletal reconstruction using bone morphogenetic proteins.* Ed T Lindholm World Scientific 2002 : 62-78
- 62 Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Iizuka Tt. Self-regenerating bone implant: ectopic osteoinduction following intramuscular implantation of a combination of rhBMP-2, atelopeptide type I collagen and porous hydroxyapatite. *J Craniomaxillofac Surg.* 1996 ;24:360-5
- 63 Oda S, Kinoshita A, Higuchi T, Shizuya T, Ishikawa I. Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Med Dent Sci.* 1997 ;44:53-62.
- 64 Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol.* 1981 ;88:473-85.
- 65 Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int.* 1999 ;65:83-9.
- 66 Gao T, Lindholm TS, Marttinen A, Urist MR. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *Int Orthop.* 1996;20:321-5.
- 67 Sampath Tk. Biology of BMP's. *Proc 2nd Int Conf Bon Morphogne Prot, Sacramento, California 4-8 june 1997: 18*

- 68 Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, Nagai N, Dohi Y, Ohgushi H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 1998 ;39:190-9
- 69 Kawamura M, Iwata I, Sato K, Miura T. Chondroosteogenetic response to crude bone matrix proteins bound to hydroxyapatite. *Clin Orthop*. 1987 ;217:281-92.
- 70 Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* . 1997 ;121:317-24.
- 71 Hulbert Sf, Young Fa, Mathews Rs, Klawitter Jj, Talbert Cd, Stelling Fh. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res*. 1970 ;4:433-56.
- 72 Glass Da, Mellonig Jt, Towle Hj. Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hydroxyapatite in an extraskeletal site of the rat. *J Periodontol*. 1989 ;60:121-6.
- 73 Jeppsson C, Aspenberg P. BMP-2 can inhibit bone healing. Bone-chamber study in rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1996 ;67:589-92.
- 74 Aspenberg P, Lohmander Ls, Thorngren Kg. Failure of bone induction by bone matrix in adult monkeys. *J Bone Joint Surg*. 1988B;70:625-7.
- 75 Chubinskaya S, Kuettner Ke. Exogenous and endogenous OP-1 in articular cartilage. In *Advances in skeletal reconstruction using bone morphogenetic proteins*. Ed T Lindholm World Scientific Singapore 2002 : 157-183
- 76 Seeherman H, Li R, Wozney J. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg*. 2003 : 85(A) 3S:96-108.
- 77 Chen X, Kidder Ls, Lew Wd. Osteogenic protein-1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur. *J Orthop Res* 2002: 142-150
- 78 Zhao M, Chen D. Expression of rhBMP-2 in *Escherichia coli* and its activity in inducing bone formation. In *Advances in skeletal reconstruction using bone morphogenetic proteins* ed T Lindholm World Scientific Singapore 2002 : 1-18
- 79 Capanna R. Clinical application of BMP's. 1st European clinical symposium molecular aspects of bone healing. Leeds 2004
- 80 Ro Tb, Holt Ru, Brenne At, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, Sundan A, Borset M. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene*. 2004 ;23:3024-32.
- 81 Feeley Bt, Gamradt Sc, Hsu Wk, Liu N, Krenke L, Robbins P, Huard J, Lieberman Jr. Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res*. 2005;20:2189-99.
- 82 Geesink R, Hoefnagels Nh, Bulstra Sk. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg* 1999; 81B: 710-718
- 83 Bae Hw, Zhao L, Kanim Le, Wong P, Delamarter Rb, Dawson Eg. Interviariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine*. 2006 20;31:1299-306;
- 84 Shimmin A. A review of 114 challenging orthopaedic cases treated with OP-1. In *Advances in skeletal reconstruction using bone morphogenetic proteins* Ed TS Lindholm World Scientific 2002 : 411-427
- 85 Johnson E, Urist Mr. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop* 2000; 371: 61-74
- 86 Kujala S, Raatikainen T, Ryhanen J, Kaarela O, Jalovaara P. Composite implant of native bovine morphogenetic protein (BMP) collagen carrier and biocoral in the treatment of resistant ulnar nonunions - report of five preliminary cases. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004; 124: 26-30
- 87 Zimmermann G, Moghaddam A, Wagner C, Vock B, Wentzensen A. Clinical experience with bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) in nonunions of long bones. *Unfallchirurg*. 2006 ;109:528-537.
- 88 Govender S, And Coll. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fracture : a prospective controlled randomised study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg* 2002; 84A: 2123-2134
- 89 Friedlander GE, and coll. Osteogenic protein -1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunion. *J Bone Joint Surg* 2001; 83A: 1S 151-158
- 90 Obert L, Deschaseaux F., Garbuio P. Critical analysis of safety and efficacy of BMPs. *Injury, Int. J. Care Injured*; 2005: 36S, S38-S42