

THÉRAPIE CELLULAIRE EN PATHOLOGIE OSSEUSE

J.P. HAUZEUR (1), H. VAN CAUWENBERGE (2), M. MALAISE (3), E. BAUDOUX (4), C. LECHANTEUR (4),
V. GANGJI (5)

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. Nous étudions l'effet de la thérapie cellulaire sur de tels déficits. Nous développons deux approches : la première utilise de la moelle osseuse autologue enrichie par concentration en cellules mésenchymateuses. Ce concentré est injecté dans la lésion selon une technique originale uniquement percutanée. Ce traitement a démontré son efficacité dans des ostéonécroses non fracturaires de la tête fémorale. L'effet à 2 ans est significatif sur la douleur, la fonction, la prévention du collapsus et sur la réduction de la zone nécrosée. Une seconde approche explore l'effet de cellules déjà différenciées dans la lignée ostéoblastique. La moelle osseuse est mise en culture pour provoquer *in vitro* la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses en préostéoblastes. Les cellules sont ensuite injectées en percutané dans la zone lésée. Nous appliquons ce traitement à des cas de pseudarthrose. Les résultats préliminaires sont encourageants.

MOTS-CLÉS : Ostéonécrose - Pseudarthrose - Thérapie cellulaire - Cellule mésenchymateuse - Préostéoblaste

INTRODUCTION

Le tissu osseux est un tissu extrêmement dynamique capable de soutenir les charges énormes auquel il est soumis chaque jour, et qui dépend, entre autres facteurs, de sa faculté à remodeler et réparer les microfissures ou lésions constantes qui se développent dans l'os. Le mécanisme fondamental du remodelage osseux se passe dans l'unité cellulaire de base qui a été nommée BMU (Basic Multicellular Unit) par Frost (1). Cette BMU comprend les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes inclus dans la logette de remaniement osseux (BRC = Bone Remodelling Cavity).

Le cycle de remodelage osseux commence par une prolifération et une activation des ostéoclastes. Ceux-ci proviennent d'une différen-

CELL-BASED THERAPY IN BONE DISEASES

SUMMARY : Bone remodelling 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 remodelling, 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. The deficiency in bone remodelling, present in several pathological situations, could be restored by cellular therapy. We develop two approaches : the first includes the use of autologous bone marrow samples concentrated in monocyte cells. The targeted cells are principally the mesenchymal stem cells (MSC) which can give rise to mature osteoblasts. This bone marrow concentrate is injected into the lesion by a percutaneous technique. This treatment has been efficiently applied in cases of aseptic osteonecrosis of the femoral head. The effect after 2 years is significant for pain, function, prevention of collapse and reduction of the necrotic zone. The second approach uses an intermediate stage. The bone marrow harvest is cultured to produce MSC proliferation and differentiation in preosteoblast cells. The percutaneously injected cells in the injured zone are thus already differentiated cells. We apply this treatment in cases of nonunion fractures. The preliminary results are promising.

KEYWORDS : Cell therapy - Mesenchymal stem cell - Osteonecrosis - Nonunion fracture - Preosteoblast

tiation des cellules souches hématopoïétiques. La lacune de résorption ainsi créée est ensuite colonisée par des ostéoblastes actifs qui produisent la matrice osseuse (tissu ostéoïde) riche en collagène de type 1, puis qui minéralisent cette matrice ostéoïde. Lorsque la lacune est comblée, certains ostéoblastes entrent en apoptose ou retournent à un état quiescent en restant adhérents à la surface des travées (bone lining cells). D'autres ostéoblastes se retrouvent inclus dans cette matrice. Ils prennent alors le nom d'ostéocytes. Leur contact vers l'extérieur ne se fera plus que par de fins canalicules. Malgré leur emprisonnement dans la matrice osseuse, ces ostéocytes jouent un rôle déterminant dans le contrôle du remaniement osseux. Ils peuvent percevoir les microfissures et les tensions mécaniques, et peuvent être réceptifs aux changements de l'environnement hormonal de l'os (par exemple, les glucocorticoïdes). Ils sont capables de déclencher le remodelage osseux, peut-être en communiquant avec les «bone lining cells» (2).

De même, les ostéoblastes, et surtout les préostéoblastes, régulent l'activité des ostéoclastes grâce à leur production de la cytokine RANK ligand (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B) qui va activer RANK, récep-

(1) Professeur, Chef de Clinique, (3) Professeur, Chef de Service, Service de Rhumatologie, CHU de Liège.

(2) Chef de clinique, Service de Chirurgie Orthopédique, CHU de Liège.

(4) Laboratoire de Thérapie cellulaire et génique, CHU de Liège.

(5) Chef de clinique adjoint, Service de Rhumatologie et de Médecine Physique, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles.

teur membranaire de l'ostéoclaste. Une autre production de l'ostéoblaste, l'ostéoprotégérine (OPG) peut moduler cette activation en inhibant RANKL.

Les autres intervenants dans la régulation osseuse sont des facteurs de croissance : les BMP (Bone Morphogenetic Proteins), le FGF (Fibroblast Growth Factor), le VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor), le TGF bêta (Transforming Growth Factor) et les IGF 1 et 2 (Insulin Growth Factor). Sont aussi impliqués les ions calcium et phosphore, des cytokines (IL1, 3, 6, 10, 11, 13, TNF alpha et bêta et INF gamma), et des hormones (PTH, vitamines D, calcitonine, androgènes, corticostéroïdes, oestrogènes, thyroxine, insuline, hormone de croissance).

Cette complexité explique les multiples voies d'abord thérapeutique utilisées pour intervenir sur le remodelage osseux lorsqu'il est perturbé. Nous développerons ici l'approche thérapeutique utilisant les cellules : la thérapie cellulaire. Celle-ci a pris de l'ampleur depuis la mise au point des cultures de cellules embryonnaires en 1998 (3) conduisant à l'apparition de la «médecine régénératrice». Elle s'est développée non seulement vers la thérapie cellulaire, mais aussi vers la reconstruction de tissus (tissue engineering) en créant des supports matriciels pour organiser et structurer le développement des cellules souches. Nous n'évoquerons dans cet article que la thérapie cellulaire qui n'utilise que les cellules sans support matriciel.

LES CELLULES SOUCHES

La «cellule souche» est définie comme une cellule dormante (ne proliférant pas de façon active). Elle n'est présente qu'en petit nombre dans les tissus. Les cellules souches ont la particularité de pouvoir faire une division «asymétrique» : une des cellules filles reste «cellule souche» et retourne à l'état dormant. Cela permet de maintenir le capital «cellule souche». L'autre commence à proliférer abondamment, formant une lignée de «cellules progénitrices». Celles-ci vont se différencier vers une forme différenciée «mature».

Lors du développement embryonnaire, les cellules du blastocyte gardent la capacité de reproduire l'individu tout entier : on parle de cellules souches «totipotentes». Lors de la croissance embryonnaire de l'organisme, ces cellules «totipotentes» vont se disperser dans les différents tissus et organes. Elles acquièrent des capacités préférentielles de différenciation selon le type d'origine embryonnaire (endoderme, méso-

derme, ectoderme) : elles sont alors appelées «cellules souches pluripotentes».

Après la naissance, ces cellules souches ont tendance à se spécialiser dans la production de cellules matures spécifiques de certains tissus comme la peau, la muqueuse intestinale, le foie, l'endothélium vasculaire, le tissu nerveux, les cellules hématopoïétiques, les tissus conjonctifs : elles sont appelées cellules souches adultes. Cette spécialisation resterait préférentielle puisque, dans certaines conditions, elles pourraient retrouver des qualités «pluripotentes». (4). Le milieu ambiant extracellulaire (cytokine, facteur de croissance, etc.) semble jouer un rôle déterminant tant dans le comportement de différenciation que l'éventuel retour à des capacités multipotentes.

Les cellules souches capables de produire de l'os ont reçu différentes appellations : mécano-cytes, cellules stromales médullaires, cellules souches du tissu conjonctif et cellules souches mésenchymateuses (MSC). Nous reprendrons cette dernière appellation comme la plupart des auteurs.

A l'inverse des cellules souches hématopoïétiques CD34 positives, elles ne sont malheureusement pas porteuses d'un marquage membranaire spécifique qui permettrait de les reconnaître facilement. La seule technique utilisable actuellement pour les identifier est leur mise en culture et le comptage du nombre de colonies cellulaires obtenues : les FCFU (Fibroblasts Colony Forming Units).

Les MSC sont présentes dans différents tissus : périoste, os trabéculaire, canaux haversiens de l'os cortical et de la moelle osseuse, mais aussi dans d'autres tissus comme la synoviale, le tissu adipeux et le muscle.

Des travaux suggèrent même que des MSC existeraient près des membranes basales des petits vaisseaux dans tous les tissus vascularisés (5).

LES CELLULES MÉSENCHYMATEUSES

Dans la moelle osseuse sont présentes les cellules souches hématopoïétiques qui peuvent se différencier en leucocytes, lymphocytes T et B, mégacaryocytes et en ostéoclastes.

La moelle osseuse contient aussi les MSC. Elles montrent une capacité de différenciation dans différentes lignées cellulaires et peuvent se développer en diverses cellules, incluant les adipocytes, les ostéoblastes, les chondrocytes, les myocytes, les ténocytes, les cellules nerveuses (6) et contribuer à la régénération de tissus mésenchymateux tels que l'os, le cartilage, le

muscle, le ligament, le tendon et le tissu adipeux.

Dans l'os, le remodelage continu exige la formation de beaucoup de nouveaux ostéoblastes. Les ostéoblastes à leur tour sont continuellement dérivés d'un nombre beaucoup plus petit de préostéoblastes et de cellules progénitrices en amont. Le nombre de cellules souches véritables nécessaires pour supporter ce processus peut être très petit (7). L'activation des cellules souches et la prolifération des cellules génitrices pour former de nouveaux ostéoblastes sont très accélérées suite à un trauma, une fracture, de l'inflammation, de la nécrose et des tumeurs (8).

TRAITEMENT PAR MOELLE OSSEUSE AUTOLOGUE

Une des premières méthodes de thérapie cellulaire a été l'injection locale ou générale de moelle osseuse autologue. Les cellules de la moelle osseuse contribuent à la réparation osseuse après la transplantation systémique ou locale chez l'homme. Récemment, beaucoup d'écrits ont démontré le potentiel des MSC dans l'amélioration de la cicatrisation osseuse. Les aspirations de moelle osseuse et de l'os trabéculaire ont toutes deux été identifiées comme des sources de MSC. La quantité de MSC présente dans l'aspiration de moelle est très faible : de 1/20.000 à 1/500.000 cellules mononucléées (9).

Au laboratoire, la MSC de la moelle osseuse peut être isolée et expansée par des protocoles relativement simples de culture de cellules adhérentes.

L'utilisation de moelle osseuse concentrée, c'est-à-dire enrichie en cellules souches, est préférable à une moelle osseuse non concentrée. L'étude de Muschler et coll. en est une belle démonstration (10). Dans un modèle animal d'arthrodèse vertébrale utilisant de la poudre d'os cortical, la comparaison de la poudre simple, avec la même poudre imprégnée de moelle ou de moelle concentrée démontre que la concentration augmente nettement la performance de l'ostéogénèse.

Nous avons voulu tester ce type de traitement utilisant une injection de moelle concentrée dans l'ostéonécrose.

L'ostéonécrose aseptique (ON) est une affection osseuse qui se caractérise par des infarctus osseux. Les lésions qui touchent les épiphyses (surtout la tête fémorale) peuvent se fracturer et

entraîner une souffrance articulaire majeure, au point de nécessiter une prothèse totale.

Jusqu'à présent, les études sur la physiopathologie de l'ON ont porté sur les mécanismes vasculaires pouvant déclencher la nécrose : hypothèses vasculaires, avec interruption du flux artériel, capillaire ou même des sinusoides intra-osseux et hypothèse embolique. Dès lors, les démarches thérapeutiques portaient de l'hypothèse que l'enjeu est le rétablissement d'une vascularisation optimale. Pourtant, l'ischémie ne semble pas pouvoir à elle seule expliquer la survenue de l'ON fracturaire. Il y a tout d'abord l'étude de Johnson et Crothers en 1976 (11) qui compare le devenir de têtes fémorales totalement dévascularisées chez les chiens. Une moitié de ces têtes est mise dans des conditions de revascularisation optimale, l'autre au contraire est maintenue isolée de toute possibilité de revascularisation. Après deux ans et demi, 50% des têtes fémorales revascularisées se sont effondrées au contraire des têtes fémorales nécrotiques non revascularisées. Le rôle paradoxalement délétère de la revascularisation est également attesté par la signification pronostique du type de signal IRM du séquestre (12). Le séquestre de signal T1 normal est en effet composé de tissus ostéo-médullaires momifiés (13). Il change de signal lorsqu'une revascularisation pénètre dans le séquestre et vient nettoyer la zone de nécrose (13). Mais, au contraire des lésions fracturaires normales où la réaction ostéoblastique explose pour former un cal osseux très rapidement, dans l'ON, la réaction ostéoblastique est «minable, peu active et lente» (13). Bref, l'ON comporte une réponse ostéoblastique inadéquate qui pourrait à elle seule expliquer la survenue de la fracture. Celle-ci est de façon très caractéristique une dissection partant de la périphérie, à la jonction de la zone de revascularisation et du séquestre pour se propager au sein du séquestre en voie de revascularisation.

L'évaluation de la réponse ostéoblastique dans l'ON a fait l'objet de publications. Hernigou et al. ont rapporté que l'os de la région intertrochantérienne de fémur atteint d'ON sur corticothérapie possédait un nombre diminué de cellules mésenchymateuses et d'ostéoblastes (14).

Notre équipe a comparé des ostéoblastes prélevés, d'une part, chez des ON et, d'autre part, chez des arthrosiques lors de la mise en place d'une prothèse totale de hanche (15). Les performances métaboliques en termes, de production de phosphatases alcalines basales et après stimulation par vitamine 1,25 (OH)₂ D₃ et en termes de production de collagène sont normales. Par contre, la rapidité de reproduction (mesurée

par le temps de doublement de la population) est nettement réduite dans l'ON. Si ces recherches doivent être poursuivies, il n'en reste pas moins que les données acquises confirment que l'ostéoblaste joue un rôle déterminant dans l'ON.

C'est ce qui a conduit à formuler l'hypothèse qu'une voie de traitement de l'ON pouvait être l'enrichissement de la zone de nécrose par des cellules souches mésenchymateuses en ayant recours à l'injection *in loco* de moelle autologue. La première équipe à faire état des possibilités de traiter l'ON par greffe de moelle autologue fut celle d'Hernigou qui publie, en 1997, les résultats d'un cas de drépanocytose avec ON de la tête humérale (16). Cette équipe a poursuivi ce programme et en a présenté les résultats récemment (17).

Dès 1998, nous avons mis sur pied un protocole de traitement de l'ON par moelle autologue.

Notre première étude a porté sur des têtes fémorales ayant une ON non fracturaire (stades 1 et 2), a comporté une série contrôle et une évaluation en aveugle (18). Un prélèvement de 400 ml de moelle est réalisé au niveau des os iliaques. Cette moelle est directement traitée en milieu stérile à l'unité de thérapie cellulaire. Après filtration, un séparateur de cellules Cobe permet de concentrer les cellules monocytaires dans un volume final d'environ 50 ml. Le forage se fait selon notre technique (19) en utilisant un trocart spécial de 3 mm de diamètre interne. Les hanches contrôles ont bénéficié de ce forage seul. L'injection de moelle se fait après mise en place du trocart dans le séquestre sous contrôle radioscopique. En moyenne l'échantillon réinjecté comprenait 2.10^9 leucocytes dont 1 % de CD34+ (cellules souches hématopoïétiques) et 92.10^7 FCFU. A deux ans, 10 hanches greffées ont été comparées à 8 hanches contrôles. Les deux groupes présentaient des caractéristiques identiques : âge, sexe, étiologies (surtout corticoïdes), sévérité de la douleur et du handicap fonctionnel, caractéristiques IRM (y compris % de surface portante atteinte et volume du séquestre). Les résultats à 2 ans d'évolution démontrent une nette différence en faveur du groupe traité en ce qui concerne la douleur (EVA : $p=0.021$), la fonction (Lequesne : $p=0.001$; WOMAC : $p=0,013$), la progression vers un stade fracturaire ($p=0,043$) et la survie de la hanche (0 *versus* 2 PTH). De plus le volume du séquestre, mesuré sur IRM, diminue de 30% pour une légère augmentation dans le groupe contrôle ($p=0,001$).

Même si ces données sont préliminaires, elles justifient que de telles études soient poursuivies

avec pour objectif de permettre, par une recolonisation ostéoblastique, une cicatrisation rapide du séquestre, c'est-à-dire dans un temps équivalent à une consolidation normale de fracture.

TRAITEMENT PAR GREFFE DE PRÉOSTÉOBLASTES

Les cellules primitives passent par plusieurs stades, celui de cellules multipotentes, puis d'ostéoprogéniteurs, puis de préostéoblastes avant de devenir des ostéoblastes, puis des ostéocytes. Le stade de préostéoblaste est caractérisé par des cellules capables de produire, entre autres, de la phosphatase alcaline et de la «*bone sialo protéine*». Elles peuvent aussi être caractérisées par la présence du récepteur de surface CD105 et l'absence des récepteurs de surface CD 34 et CD 45.

La MSC cultivée et expansée en laboratoire peut être guidée vers différentes voies de différenciation, en utilisant certaines conditions de culture, spécifiques pour chaque voie de différenciation.

La production totalement humanisée de préostéoblastes autologues à partir de MSC médullaires du patient a pu être mise au point dans notre laboratoire.

Les préostéoblastes injectés dans la zone d'os à reconstruire vont s'implanter et, en proliférant, se transformer en ostéoblastes actifs.

Une des applications envisagées est le traitement de la pseudarthrose. On appelle pseudarthrose une fracture qui, après 6 mois, ne consolide pas.

Cette absence de cicatrisation osseuse pourrait survenir dans 5 à 10 % des fractures. Ces pseudarthroses peuvent être hypertrophiques ou atrophiques (20). La pseudarthrose hypertrophique correspond à une prolifération osseuse, souvent exubérante, mais inefficace parce qu'elle n'arrive pas à former un cal osseux complet. La cause de ce type de pseudarthrose est essentiellement mécanique : instabilité excessive de la fracture (21).

Dans la pseudarthrose atrophique, le foyer de fracture est occupé par du tissu fibreux qui ne s'ossifie pas. Elle est provoquée par une insuffisance de vascularisation ou d'ostéogenèse (21). Les facteurs étiologiques sont multiples, fixation trop ou trop peu rigide, nécrose vasculaire par infection ou choc à haute énergie, l'âge avancé, le tabagisme, le déficit alimentaire en calcium, vitamine D, les maladies systémiques et la corticothérapie.

Les anti-inflammatoires (indométacine et autres) ont été également reconnus comme facteurs de risque de pseudarthrose (22, 23, 24), probablement par leur effet d'inhibition de la cyclo-oxygénase et de la production des prostaglandines ostéoinductrices. Récemment, le rofecoxib et le celecoxib, inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase type 2 (COX2 sélectif) ont aussi démontré un effet inhibiteur de la réparation osseuse, probablement par l'inhibition de l'angiogenèse (25, 26).

Nous avons entrepris une étude pilote incluant 10 patients ayant une pseudarthrose atrophique. Un prélèvement de 40 ml de moelle osseuse est réalisé sous anesthésie locale au niveau de la crête iliaque postérieure. Les cellules sont mises en culture pendant 3 semaines. Les cellules obtenues sont récoltées et mises dans un volume de 2 à 5 ml. Nous utilisons notre technique percutanée pour mettre le trocart spécial (3 mm diamètre) dans la zone de pseudarthrose sous contrôle radioscopique (19). Le tissu fibreux est perforé et retiré en partie puis les cellules sont injectées. Une décharge stricte du membre traité est demandée jusqu'à apparition du cal osseux. Les premiers résultats sont très encourageants. Dans les 7 premiers cas (1 clavicule, 2 humérus, 1 poignet, 1 fémur, 1 tibia et 1 péroné), une consolidation partielle apparaît après en moyenne 3 mois (2-4 mois) et la consolidation totale est obtenue après en moyenne 4,8 mois (3-8 mois). Aucune complication n'a été observée.

THÉRAPIE GÉNÉTIQUE

Cette stratégie thérapeutique consiste à récolter et manipuler le matériel génétique des cellules autologues pour leur faire produire des protéines ostéoinductrices. Les processus techniques comportent la transfection du nouveau gène par des vecteurs viraux ou non viraux. L'ostéogenèse imparfaite a été la première application de ce type d'approche thérapeutique (27, 28). Cette affection génétique est due à une mutation dans le gène responsable de la production du collagène de type 1. Ce déficit entraîne une fragilité osseuse sévère. La technique a comporté une destruction des cellules mésenchymateuses du patient par irradiation de tout le corps puis leur remplacement par des cellules mésenchymateuses génétiquement saines. Une première approche thérapeutique a comporté une injection intraveineuse de cellules médullaires allogéniques de sujets sains (27). Une autre approche a utilisé des cellules autologues transgéniques (28). Dans le cas des cellules autologues transgéniques, il s'agit de cellules médullaires prélevées aupara-

vant chez le patient, puis cultivées pour en augmenter le nombre et pour être transfectées par un rétrovirus porteur du gène collagène 1 sain. Les résultats préliminaires sont encourageants.

D'autre part, s'est développée une recherche de thérapie génique ayant pour objectif l'enrichissement local ou général en l'un ou l'autre facteur de croissance ostéoinducteur. C'est ainsi que des publications d'expériences animales concernent la BMP2. Ce facteur de croissance fait partie d'une famille qui compte actuellement 17 formes. Les plus étudiés sont la BMP2 et la BMP7. Des productions des 2 formes par génie génétique sont commercialisées sous le terme de BMP humaine recombinante (rh-BMP). Ces produits sont déposés localement dans le site à traiter adsorbé sur un support pouvant être colonisé par les cellules médullaires. Des cellules médullaires ont été, chez l'animal, génétiquement modifiées pour produire en grande quantité de la BMP2. La comparaison entre l'injection de rh-BMP2 et ces cellules médullaires transfectées démontre une efficacité équivalente pour combler un trou osseux dans un fémur de rat nude (29).

L'utilisation de cellules endothéliales transfectées pour la production d'un facteur de croissance des vaisseaux, le VEGF s'est également révélée efficace dans des modèles d'ostéonécrose chez le lapin pour produire une revascularisation d'un os nécrotique ou même pour reconstruire de l'os nouveau (30).

Mais, l'intérêt majeur de cette voie thérapeutique serait de produire à long terme des lignées de cellules «réadaptées» qui survivraient au sein de l'organisme traité et qui auraient ainsi une action à long terme. Cette hypothèse doit encore être démontrée.

CONCLUSION

La médecine, en appréhendant mieux les processus de croissance cellulaire, a entamé un nouveau chapitre, celui de la reconstruction tissulaire.

Le tissu osseux est, lui aussi, concerné par cette démarche thérapeutique originale.

La thérapie cellulaire osseuse peut emprunter des voies différentes : la moelle osseuse, les préostéoblastes et les cellules médullaires génétiquement modifiées. Les premières applications humaines donnent des résultats préliminaires encourageants.

BIBLIOGRAPHIE

1. Frost HM.— Tetracycline-based histological analysis of bone remodelling. *Calcif Tissue Res*, 1969, **3**, 211-237.
2. Everts V, Delaisse JM, Korper W et al.— The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*, 2002, **17**, 77-90.
3. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al.— Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**, 1145-1147.
4. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al.— Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, **418**, 41-49.
5. Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, et al.— The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop*, 1992, **275**, 287-299.
6. Jones EA, Kinsey SE, English A et al.— Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*, 2002, **46**, 3349-3360.
7. Connolly JF.— Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res*, 1995, **313**, 8-18.
8. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C.— Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. *J Biomed Biotechnol*, 2003, **2003**, 170-193.
9. Caplan AI. Mesenchymal Stem cells : cell-Based reconstructive therapy in orthopedics.— *Tissue Engineering*, 2005, **7**, 1198-1211.
10. Muschler GF, Matsukura Y, Nitto H, et al.— Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. *Clin Orthop*, 2005, **432**, 242-251.
11. Johnson JT, Crothers O.— Revascularization of the femoral head. A clinical and experimental study. *Clin Orthop*, 1976, **114**, 364-373.
12. Mitchell DG, Steinberg ME, Dalinka MK, et al.— Magnetic resonance imaging of the ischemic hip. *Clin Orthop*, 1989, **244**, 60-77.
13. Hauzeur JPh, Pasteels JL, Orloff S.— Bilateral non-traumatic aseptic osteonecrosis in the femoral head. A experimental study of incidence. *J Bone Joint Surg*, 1987, **69**, 1221-1223.
14. Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC.— Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Br*, 1999, **81**, 349-355.
15. Gangji V, Hauzeur JPh, Schoutens A, et al.— Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol*, 2003, **30**, 348-351.
16. Hernigou P, Bemaudin F, Reinert P, et al.— Bone-marrow transplantation in sickle-cell disease. Effect on osteonecrosis: a case report with a four-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am*, 1997, **79**, 1726-1730.
17. Hernigou P, Beaujean F.— Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop*, 2002, **405**, 14-23.
18. Gangji V, Hauzeur JPh, Matos C, et al.— Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells : a pilot study. *JBJS Am*, 2004, **86**, 1153-1160.
19. Hauzeur JPh, Orloff S, Taverne-Verbanck J, et al.— Diagnosis of aseptic osteonecrosis of the femoral head by percutaneous transtrochanterian needle biopsy. *Clin Rheumatol*, 1986, **5**, 346-358.
20. Van Cauwenberge H, Hauzeur JP, Gillet P.— Update in non-union treatment. *Rev Med Liège*, 2007, **62**, 344-351.
21. Lemaire R.— Management of nonunions : an overview, in Duparc J (ed). *Surgical Techniques in Orthopaedics and Traumatology*. Elsevier, Paris, 2000, **55**, 1-10.
22. Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, et al.— Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bone Joint Surg Br*, 2000, **82**, 655-658.
23. Burd TA, Hughes MS, Anglen JO.— Heterotopic ossification prophylaxis with indomethacin increases the risk of long-bone nonunion. *J Bone Joint Surg Br*, 2003, **85**, 700-705.
24. Glassman SD, Rose SM, Dimar JR, et al.— The effect of postoperative nonsteroidal anti-inflammatory drug administration on spinal fusion. *Spine*, 1998, **23**, 834-838.
25. Murnaghan M, Li G, Marsch DR.— Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced fracture nonunion: an inhibition of angiogenesis? *J Bone Joint Surg Am*, 2006, **88**, 140-147.
26. Daluiski A, Ramsay KE, Shi Y, et al.— Cyclooxygenase-2 inhibitors in human skeletal fracture healing. *Orthopedics*, 2006, **29**, 259-261.
27. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al.— Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 1999, **5**, 309-313.
28. Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, et al.— Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, 2004, **303**, 1198-1201.
29. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, et al.— The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am*, 1999, **81**, 905-917.
30. Katsube K, Bishop AT, Simari RD, et al.— Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. *Orthop Res*, 2005, **23**, 469-474.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. J.P. Hauzeur, Service de Rhumatologie, CHU Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.
Email : jean-philippe.hauzeur@chu.ulg.ac.be