



HAL
open science

Inflammation et paraostéoarthropathies neurogènes

Marjorie Salga

► **To cite this version:**

Marjorie Salga. Inflammation et paraostéoarthropathies neurogènes. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLV072 . tel-02525114

HAL Id: tel-02525114

<https://theses.hal.science/tel-02525114>

Submitted on 30 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Inflammation et paraostéoarthropathies neurogènes

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'UVSQ

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Physiologie, physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Garches, le 22 novembre 2019, par

Marjorie Salga

Composition du Jury :

Djamel Bensmail Professeur, hôpital Raymond Poincaré, UVSQ (U1179)	Président
François Genêt Professeur, hôpital Raymond Poincaré, UVSQ (U1179)	Directeur de thèse
Anne-Claude Crémieux Professeure, hôpital Saint Louis, Université Paris-Diderot	Rapporteur
Martine Cohen-Solal Professeure, Université Paris-Diderot (Inserm U1132)	Rapporteur
Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès Professeure, Hôpital Paul Brousse, Paris Sud (INSERM U 972)	Examinatrice
Eric Lapeyre Professeur, hôpital de Percy	Examineur
Bertrand Coulet Professeur, hôpital de Montpellier	Examineur
Jean-Pierre Levesque Professeur, Mater Research Institute (Stem Cell Biology Group)	Invité

Titre : Inflammation et paraostéarthropathies neurogènes

Mots clés : ostéome, ossification hétérotopiques, ossification hétérotopique neurogène, paraostéarthropathies, paraostéarthropathies neurogène, traumatisme crânien, blessé médullaire, accident vasculaire cérébral, inflammation, infection

Résumé : Les ossifications hétérotopiques (OH) sont des formations osseuses bénignes anormalement situées dans les tissus mous du corps humain. Les OH peuvent être d'origine génétique, acquise et idiopathique. Elles sont appelées paraostéarthropathies neurogènes (POAN) lorsqu'elles se développent après une lésion du système nerveux central. Cette thèse a pour objectif de préciser les facteurs inflammatoires locaux et systémiques, impliqués dans la survenue de POAN. Nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'injection de composants de paroi membranaire bactérienne dans un modèle de souris développant des ossifications hétérotopiques neurogènes (OHN) après section médullaire et injection intramusculaire d'un myotoxique chimique. L'injection locale intramusculaire comme systémique d'un composant de paroi d'*Escherichia Coli* ou de *Staphylococcus Aureus* a permis d'augmenter de façon significative le volume des OHN. A l'issue de ces expériences, il semble que le niveau d'inflammation intramusculaire influence de façon importante le volume des OHN, selon un effet-dose. La provenance des agents de paroi bactérienne fait supposer que l'inflammation pourrait être spécifiquement induite par des pathogènes infectieux. Il semblerait qu'il existe un niveau inflammatoire seuil à partir duquel, la section médullaire ne soit plus obligatoire à la survenue d'OH. Toujours dans le même modèle murin, nous avons montré que le blocage de la jonction neuro-musculaire par une injection de toxine botulique augmente le volume des OHN. La jonction neuro-musculaire semble réguler le développement de OHN dans un muscle pathologique chez la souris avec section médullaire. Il est possible que cette régulation s'effectue via un mécanisme de neuro-inflammation locale. Suite à ces découvertes en recherche fondamentale, nous avons mené une étude cas-témoins recherchant des facteurs pourvoyeurs d'inflammation à la phase très précoce suivant l'accident neurologique, qui

pourraient être corrélés à l'apparition de POAN. Cette étude a été la première à montrer que les patients avec POAN présentent de façon plus importante des infections à *Pseudomonas Aeruginosa*. La présence de traumatismes associés et de chirurgies était corrélée à la survenue de POAN, tout comme la longueur de la ventilation mécanique, du coma, du séjour en réanimation et la présence d'une trachéotomie. En revanche, aucun critère neurologique n'était associé à une augmentation du risque de POAN. A gravité neurologique égale, il semble donc que les patients développant des POAN présentent un niveau d'inflammation plus élevé (infections, polytraumatisme, chirurgies multiples, réanimation) que les patients sans POAN. Comme pour d'autres pathologies articulaires avec une composante inflammatoire, nous avons infiltré des dérivés cortisonés localement, dans le but de traiter les douleurs induites par certaines POAN. Un mois après l'injection, 80% des patients présentaient un soulagement des douleurs. Ce traitement local paraît être une alternative intéressante à la prise en charge antalgique des POAN douloureux.

Les POAN sont toujours, à l'heure actuelle, diagnostiqués et prises en charge tardivement lors de l'apparition de complications. L'enjeu actuel est d'identifier les patients à risque de développer des POAN, le plus tôt possible après leur accident neurologique de façon à leur assurer un suivi et une prise en charge adaptée et précoce. En se basant sur les études cliniques et les données issues du modèle murin développant des POAN, nous allons relever des critères cliniques et biologiques reconnus comme étant corrélés à l'apparition de POAN dans une base de données clinico-biologique. Ce tout premier travail prospectif sur les POAN permettra de repérer les patients à risque de développer des POAN et peut être à terme d'identifier des cibles thérapeutiques qui permettront de prévenir ou de guérir les POAN.



Title : Neurogenic heterotopic ossification and inflammation

Keywords : heterotopic ossification, neurogenic heterotopic ossification, traumatic brain injury, spinal cord injury, stroke, inflammation, infection

Abstract : Heterotopic ossifications (HO) are abnormal ectopic bone formations that develop in soft tissues. HO can be related to genetic factors or acquired pathologies. HO occurring after central nervous system lesion are called neurogenic HO (NHO). The objective of this project is to identify local and systemic inflammatory factors that may be associated with occurrence of NHO. We study first, the effect of bacterial membrane components on the development of NHO in a mouse model of spinal cord injury triggered by injection of a myotoxic compound into muscle. Local and systemic administration of membrane components from *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* significantly increased the volume of NHO. Changes in the level of inflammation, which was dose responsive, correlated with changes in NHO volume suggesting that inflammation influences NHO formation. As bacterial membrane components were also linked to increased volumes of NHO, it is possible that inflammation triggered by infectious pathogens could also be involved in NHO development. Furthermore, we identified that after reaching a certain threshold of inflammation, triggered by administration of bacterial membrane components, spinal cord injury was not required for NHO formation. Further experiments with this model involved determining the effect of blocking neuromuscular signaling on NHO formation. Botulinum toxin injection increased the size of NHO. Therefore, neuromuscular signaling also modulates NHO development in damaged muscles of spinal cord-injured mice. By extension, local neuroinflammation was implicated in regulating neuromuscular signals received by affected muscles. Based on these preclinical results, we carried out a case-control study to look for factors inducing inflammation that could be linked with NHO occurrence, and which occur at early stages after neurological trauma. This study identifies for the first time that patients with *Pseudomonas Aeruginosa*-positive infections were more likely to develop NHO. NHO patients more frequently experience

surgery and polytrauma, compared to patients without NHO. Furthermore, extended stays in intensive care, long periods of mechanical ventilation, enduring coma, or patients with a tracheotomy were more frequent in patient with NHO. In contrast, no neurological factors were associated with a higher risk of developing NHO. Patients with comparable neurological trauma severity were more susceptible to develop NHO when they were experiencing a high level of inflammation (infection, polytrauma, surgeries, intensive care). Like for other inflammatory joint pathologies, we performed a further study which involved the infiltration of NHO with corticosteroid locally, in order to treat pain induced by NHO formation. One month after treatment, 80% of patients reported an improvement of pain. Therefore, we demonstrate that corticosteroid infiltration at the site of NHO is an effective treatment for pain associated with NHO. Detecting patients that are at risk to develop NHO as early as possible after an accident is imperative, to adapt rehabilitative strategies or treatment needs specific for patients that develop NHO. However, NHO diagnosis occurs during late phase of disease, when complications are occurring. To address this shortfall in the detection of NHO formation, we are undertaking the first prospective study of NHO, where clinical and biological information will be recorded to make a database. The specific data to be collected has been defined by our previous research in the mouse model and earlier clinical studies, and will identify specific biological and clinical factors that can be monitored to identify patients at risk to develop NHO. The outcomes of this project have specific implications in the understanding the drivers of NHO formation and its detection. Global outcomes of this project include improving patient management and possibly the prevention of NHO formation in patients.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du Jury d'avoir accepté d'être présents à cette soutenance de thèse et d'avoir fait le déplacement sur Garches. Merci à Mesdames les Professeures Cohen-Solal et Crémieux d'avoir endossé la lourde tâche de reviewing sur un sujet qui ne vous est pas familier.

Mes remerciements vont ensuite à François Genêt, mon directeur de thèse, qui m'accompagne depuis mes débuts dans le monde de la Médecine Physique et de Réadaptation. Je suis heureuse d'avoir croisé ta route, un jour de mai 2011. A l'époque c'est toi qui passait ta thèse et qui t'apprêtais à aller vivre l'expérience en down-under, alors que je découvrais le merveilleux monde de la neuro-orthopédie. Quelques années plus tard, c'était à mon tour d'aller démarrer ma thèse de science en Australie et nous voilà aujourd'hui à l'aube de la création d'un service de neuro-orthopédie. Merci de m'embarquer dans des aventures toujours plus belles. Merci pour ton parrainage, ton soutien, tes encouragements. Merci de me transmettre au quotidien l'héritage garchois avec cette motivation et énergie si communicatrice qui ne te quitte jamais. J'ai également une pensée pour Serge Poiraudéau qui m'a mis sur ton chemin et qui a cru en moi dès mes premiers pas d'interne en région parisienne.

Je remercie également mes co-chefs et collègues, Laura, Mélanie, Elodie, Clémence, Alexis et Julie pour leur disponibilité. Vous avez absorbé mes absences malgré vos emplois du temps bien chargés. Vous avez su m'écouter, me rassurer et m'encourager. Merci d'avoir fait en sorte que cette thèse se concrétise et se déroule sous les meilleurs hospices.

Merci également à Philippe Azouvi, mon chef de service, qui a toujours su se rendre disponible pour répondre à mes questions et me donner des conseils avisés.

Un petit mot pour l'équipe de Netter avec qui j'ai plaisir à travailler tous les jours dans le service. Merci pour votre professionnalisme, votre dynamisme, votre courage et votre solidarité qui font de vous une équipe exceptionnelle.

J'ai également une pensée pour mes confrères neuro-orthopédistes Philippe, Laure, Fabien, Antoine, Nadine. Plus le temps passe et plus nos collaborations s'enrichissent. Nous avons de très beaux projets en perspectives. Je tiens à remercier tout particulièrement Philippe Denormandie pour son héritage qu'il transmet si bien, ses idées toujours plus créatives, ses conseils si précieux.

Je remercie également les australiens qui m'ont si chaleureusement accueillis. La NHO team, JP Levesque, Kylie Alexander, Hsu Wen Tseng, Beulah Jose qui ont supporté mon anglais approximatif et m'ont coaché de la plus belle des façons dans le monde de la recherche fondamentale. Merci à Val et Ray pour ces randonnées toujours plus folles et somptueuses. Merci à mes colocataires Katy, Lisa et Maria pour ces soirées Games of thrones, de m'avoir emmené partout où vous alliez pour me faire

découvrir ce magnifique pays. Une pensée pour Charlotte, actuellement australienne, avec qui j'ai eu le plaisir de débiter la recherche sur les paraostéoarthropathies en Master 2.

Je tiens à remercier Sébastien Banzet, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdiles et leur équipe pour leur confiance depuis le début de notre collaboration. Nos échanges translationnelles entre monde clinique et fondamental sont toujours très intéressantes et productives. J'espère très sincèrement que nos projets aboutiront.

Un grand merci à mes amis de MPR, Thibaud, Jojo, Charly, Clara, Mel, Vic et Guillaume et tous les autres pour votre présence tout au long de l'internat et au-delà. Il est loin le temps de l'AJMER et des soirées de la SOFMER où nous faisons connaissance. Tous différents mais si complémentaires, des projets plein la tête, quelle équipe de choc ! J'ai la chance de travailler avec la plupart d'entre vous ce qui embellit mon quotidien. Les autres ne sont jamais bien loin. Merci à Clara d'avoir gentiment accepté de relire ma prose.

Je voudrais également remercier les copains toulousains en commençant par mes colloc, Sandrine, Sophie blonde, Emma mais aussi Cynthia, Ben, Sophie brune, Floflo, Denys, Jé, Max, Souille, Lu. Des bancs de la fac toulousaine, on s'est quitté pour aller vivre aux 4 coins de la France sans jamais se perdre de vue. Certains ont poursuivi l'aventure parisienne à mes côtés avant de partir pour de nouvelles aventures. Un merci tous particulier à Sandrinette, chercheuse brillante et passionnée qui m'a insufflé l'amour de la science. Merci pour les coups de main de dernière minutes pour mes articles de biblio et mes présentations orales.

Merci à ma super Maman de m'avoir toujours donné la force et l'inspiration de me battre pour aller plus loin. Merci à mon Papa de m'avoir toujours encouragé avec tendresse. Merci à Cathie de m'avoir donné l'envie de me battre pour mes convictions. Merci à ma petite Mamie, Jacques, François, Eva, Marine pour votre soutien et vos encouragements sans toujours bien savoir où j'en étais dans mes études, recherches, démarches universitaires et monde hospitalier.

Enfin, un grand merci à mon merveilleux compagnon, Oscar, pour son soutien et son accompagnement tout au long de ce travail de thèse. Merci pour ta gentillesse, ta patience, ton amour au quotidien qui m'ont aidé à traverser les moments les plus durs avec courage. Merci d'enrichir ma vie tous les jours autant sur le plan personnel que scientifique. Merci d'avoir fait de la place dans ta vie pour moi et bientôt pour baby bean...

Merci à toutes les personnes qui auront fait le déplacement pour ma soutenance de thèse.

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	6
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	13
I. Introduction générale.....	14
II. Les différentes formes d'ossifications hétérotopiques.....	17
1. Les formes génétiques.....	17
1.2 La fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP).....	17
1.3 Maladies génétiques issues de mutations hétérozygotes inactivatrices du gène <i>GNAS</i>	19
2. La myosite ossifiante circonscrite.....	21
3. Les paraostéoarthropathies.....	22
3.1 Leurs points communs.....	22
3.1.1 Localisations péri-articulaires.....	22
3.1.2 Symptômes cliniques.....	26
3.1.3 Signes radiologiques.....	28
3.1.4 Paramètres biologiques.....	30
3.1.5 Méthodes de préventions.....	30
3.1.6 Exérèse chirurgicale, seul traitement curatif.....	35
3.2 Leurs divergences : prévalence et facteurs de risques.....	39
3.2.1 Traumatisme orthopédique.....	39
3.2.2 Brûlures étendues.....	41
3.2.3 Amputations traumatiques.....	41
3.2.4 Atteinte du système nerveux central.....	42
3.2.5 Long séjour en réanimation.....	45
3.3 Conclusion.....	46
III. L'inflammation aigüe.....	49
IV. Recherche fondamentale et POAN.....	51
1. Conditions physiologiques.....	51
1.1 Régénération du muscle strié squelettique.....	51
1.1.1 Muscle strié squelettique sain.....	51
1.1.2 Dégénérescence musculaire.....	53
1.1.3 Régénération musculaire (Figure 13).....	55
1.1.4 Phase de remodelage.....	56
1.2 Ostéogénèse physiologique [200,201].....	56
1.2.1 Tissu osseux sain.....	56
1.2.2 Ostéogénèse.....	60

2.	Conditions pathologiques et formation de POAN	64
2.1	Schématisation des hypothèses physiopathologiques	65
2.2	Atteinte musculaire	66
2.2.1	A l'échelle humaine : aspect macroscopique	66
2.2.2	A l'échelle animale : modèle murin induisant des OHN	67
2.2.3	A l'échelle cellulaire, quels sont les mécanismes en cause dans la/les lésion(s) musculaire(s) ?	70
2.3	Inflammation locale	74
2.3.1	Bone Morphogenic proteins	74
2.3.2	Hypoxia inducible factor alpha	75
2.3.3	Récepteur nucléaire de l'Acide Rétinoïque	76
2.3.4	Neuroinflammation	77
2.4	Lésion aigüe du SNC	78
2.4.1	Dérégulation du système nerveux autonome (SNA).....	78
2.4.2	Dérégulation endocrinienne	79
2.4.3	Dérégulation du système immunitaire	79
2.4.4	Potentiel ostéogénique	80
2.5	Facteurs systémiques.....	80
2.5.1	Attestation de la présence de facteurs systémiques	81
2.5.2	Facteurs inflammatoires libérés dans la circulation systémique	81
2.5.3	Facteurs inflammatoires systémiques cheminant via le SNP : la substance P	83
2.5.4	Perspectives	84
2.6	Macrophages et cytokines	84
2.6.1	Rôle clef des macrophages activés.....	84
2.7	Cellules musculaires progénitrices.....	85
2.8	Différenciation cellulaire vers les POAN	88
V.	Articles et Etudes	90
	CHAPITRE 1 : Effet de l'injection d'agents de paroi bactérienne et inflammation induite sur le développement des OHN chez les souris.....	91
1.	Introduction.....	91
2.	Matériel et méthode général du modèle murin développant des OHN.....	91
2.1	Population	91
2.2	Procédures expérimentales.....	92
2.3	Préparation des échantillons.....	92
2.4	Acquisition scannographique	93
2.5	Analyses statistiques	93
3.	Inflammation étudiée au travers du modèle murin développant des OHN.....	93
3.1	Inflammation locale, intramusculaire par des lipopolysaccharides	93
3.1.1	Objectif.....	93

3.1.2 Matériel et méthode supplémentaire	93
3.1.3 Résultats	94
3.2 Inflammation locale musculaire par l'acide lipoteichoic	95
3.2.1 Objectifs	95
3.2.2 Matériel et méthode supplémentaire	95
3.2.3 Résultats	96
3.3 Inflammation systémique	97
3.3.1 Objectifs	97
3.3.2 Matériel et méthode supplémentaire	98
3.3.3 Résultats	99
3.4 Discussion et conclusion	99
CHAPITRE 2 : Etudier l'impact de l'injection intramusculaire de toxine botulique sur le volume des OHN dans le modèle murin : hypothèse de la modulation du signal de la JNM, notamment inflammatoire dans la formation des OHN.	104
CHAPITRE 3 : Etude de facteurs inflammatoires intervenant dans les processus de formation de POAN à un stade précoce suivant un traumatisme crânien chez l'Homme.....	116
CHAPITRE 4 : Etude de l'efficacité sur la douleur d'un traitement par infiltration de corticoïdes au site de développement des POAN chez l'Homme	136
CHAPITRE 5 : Création d'une banque de données clinico-biologiques chez des patients hospitalisés en services de soins aigües pour la recherche de marqueurs spécifiques prédictifs, notamment inflammatoires, du développement précoce de POAN chez l'Homme « BENTHOS ».	150
VI. Discussion, perspectives, conclusion.....	154
VII. Annexe.....	159
VIII. Références bibliographiques de la thèse	231

Liste des abréviations

ACh: Acetylcholine

ACRV1 : Activin A receptor type I

ALK2: Activin receptor Like Kinase-2

ADN : Acide Désoxyribo-nucléique

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BENTHOS : Biomarkers for Early development of Heterotopic Ossification

BM : Blessé Médullaire

BGN : Bacille Gram Négatif

BMP : Bone Morphogenic Protein

BTA: Botulinum Toxin type A

CD : Cluster de Différentiation

CDTX : Cardiotoxine

CGP : Cocci Gram Positif

CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide

CINC : Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant

CNS : Central Nervous System

CRP : C-Reactive Protein

CSF : Colony Stimulating Factors

CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses

Coll. : Collaborateurs

CPM : Cellules Progénitrices Mésoenchymateuses

CPP : Comité de Protection des Personnes

DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns

DRCI : Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation

FAP : Progeniteur Fibro-Adipogénique

FOP : Fibrodysplasie Ossifiante Progressive

GAS: Goal Attainment Scale

GNAS1 : Guanine Nucleotide-binding protein Alpha Stimulating 1

GNB: Gram Negative Bacillus

GPC: Gram Positive Cocci

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor-1 alpha

HMGB1 : High-Mobility Group Box 1

HO: Heterotopic Ossification

HOP : Hétéroplasie Osseuse Progressive

HSP : Heat Shock Proteins

ICU: Intensive Care Unit
IM : Intra-musculaire
IL : Interleukine
IP : Intra-péritonéal
ISS: Injury Severity Score
LCR : Liquide Céphalorachidien
LPS : Lipopolysaccharides
LTA : Lipoteichoic acid
MCP-1 : Monocyte Chemo-Attractant Protein-1
MIP-2 : Macrophage-Inflammatory Protein 2
MMP : Matrix Metallopeptidase
NSAID: Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs
NHO: Neurogenic Heterotopic Ossification
MV: Mechanical Ventilation
NMJ: Neuro-muscular Junction
OHA : Ostéodystrophie héréditaire d'Albright
OH: Ossification Hétérotopique
OHN : Ossification Hétérotopique Neurogène
OSM : Oncostatine M
PAL : Phosphatase Alkaline
PAVM : Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique
PBS: Phosphate-Buffered Saline
PHP : Pseudo-hypo-parathyroïdisme
PNS: Peripheral Nervous System
POA : Paraostéarthropathie
POAN : Paraostéarthropathie Neurogène
POC : Primary Osteoma Cutis
PPHP : Pseudo-Pseudohypoparathyroïdisme
PTH : Parathyroïde Hormone
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
SCI : Spinal cord injury
siSCI: surgically induced Spinal Cord Injury
SNA : Système Nerveux Autonome
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Système Nerveux Périphérique
SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
SP : Substance P

TBI : Traumatic Brain Injury

TC : Traumatisme Crânien

TDM : Tomodensitométrie

TGF- β : Tumor Growth Factor-Beta

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

mTORC1: Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1

TRPV1: Transient Receptor Potential Cation Channel V1

TSH : Thyroid-Stimulating Hormone

UMN: Upper Moto-neuron

VEGF α : Vascular Endothelial Growth Factor alpha

Liste des figures

Figure 1. Schématisation de l'ensemble des appellations en fonction de leur définition et de leurs caractéristiques étymologiques.	15
Figure 2. Un changement d'acide aminé du domaine intracellulaire (R206H) transforme ACVR1 en un récepteur répondant à l'activine et entraîne la stimulation de la voie de signalisation Smad 1/5/8.....	18
Figure 3. Localisations des POA en fonction de la pathologie initiale.	23
Figure 4. Classification de Walter Reed.....	23
Figure 5. Différentes localisations de POA autour du coude.	24
Figure 6. Différentes localisations de POA autour de la hanche sur des radiographies.	25
Figure 7. Evolution radiologique sur radiographie standard, de POA de hanche au cours du temps.	28
Figure 8. Chirurgie de neurolyse du nerf ischiatique lors d'une ablation d'une POAN postérieure de hanche.....	37
Figure 9. Classification de Brooker [122].....	40
Figure 10. Structure d'un muscle squelettique.....	51
Figure 11. Leucocytes dans le muscle squelettique sain.....	52
Figure 12. Schématisation des mécanismes physiologiques de réparation musculaire après un traumatisme local.....	53
Figure 13. Coupes histologiques de la régénération musculaire de muscle strié squelettique de souris endommagé par de la cardiotoxine.	55
Figure 14. Représentation schématique de l'os compact (Haversien) et os spongieux (trabéculaire)...	57
Figure 15 (A, D) Ostéoblastes, (B, E) ostéocytes, et (C, F) ostéoclastes.....	60
Figure 16. Différentes étapes de l'ossification endochondrale.	61
Figure 17. Constitution des cartilages de conjugaison.	63
Figure 18. Les 4 étapes de l'ossification intramembranaire.	64
Figure 19. Schéma des hypothèses physiopathologiques de réparation musculaire conduisant à la formation de POAN dans un contexte de traumatisme local musculaire et de lésion du système nerveux central.	66
Figure 20. Localisation intra-tissulaire des POAN.....	67
Figure 21. Modèle murin développant des OHN.	69
Figure 22. Cinétique d'évolution des OHN au cours du temps.	69
Figure 23. Volumes des OHN à 10 jours Impact 1 et Impact 2 +/- injection de LPS.	72
Figure 24. Les 6 étapes de développement des POA.	88
Figure 25. Schéma expérimental.....	94
Figure 26. Volume des POAN (OHN) 7 jours après chirurgie (BM ou SHAM) et injection de CDTX +/- LPS (n=4 à 8 par groupe)	95
Figure 27. Schéma expérimental.....	96
Figure 28. Volume des OHN 7 jours après chirurgie (BM ou SHAM) et injection de CDTX +/- LTA.....	97

Figure 29. Volume de OHN à 7 jours de la chirurgie + injection IM de CDTX avec injection IM de LPS ou injection IP de LPS ou PBS	99
Figure 30. Récepteurs et voies de signalisations induisant une réponse inflammatoire au LPS et LTA	101
Figure 31. Schéma récapitulatif de la chronologie du projet « BENTHOS ».....	152

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques distinctives des pathologies liées à des défauts génétiques et épigénétiques du locus GNAS.....	20
Tableau 2 : Facteur de risque communs et spécifiques des POA selon la pathologie d'origine.	48

I. Introduction générale

L'os se forme habituellement selon des règles spatio-temporelles bien définies par notre génome. On différencie deux types d'ossifications au cours de l'ostéogénèse : l'ossification intramembranaire et l'ossification endochondrale ou enchondrale [1,2]. Ces deux processus diffèrent de par leur origine. En effet, l'ossification endochondrale est précédée d'une maquette cartilagineuse, alors que l'os intramembranaire fait directement suite à un tissu fibreux. L'os endochondral correspond à tous les os longs, aux vertèbres et à une grande partie des os de la base du crâne [2]. Par opposition, l'ossification intramembranaire est responsable des os du crâne et de la face [1]. Contrairement à l'os endochondral, ce processus d'ossification ne passe pas par l'état cartilagineux. Le tissu conjonctif est envahi par de la substance osseuse que sécrète les cellules de ce tissu conjonctif, qui évolue directement en ostéoblastes. On les appelle des os de membrane par opposition aux autres, qui sont des os de cartilage.

Dans des conditions pathologiques, l'os peut se développer dans les tissus mous, à distance du squelette osseux et donner lieu à des formations osseuses ectopiques et bénignes. Les ossifications hétérotopiques peuvent avoir différents noms tels que « ostéome », « myosite ossifiante » ou encore « paraostéoarthropathie ». En nomenclature internationale, elles se nomment classiquement « heterotopic ossification » et plus rarement « myositis ossificans ».

Si on regarde ces mots de plus près, on peut s'apercevoir que leur signification n'est pas équivalente et qu'ils orientent, de façon plus ou moins précise, vers un cadre nosologique. Le mot « ostéome » est très généraliste car il regroupe l'ensemble des tumeurs osseuses bénignes ectopiques mais aussi du squelette osseux. Il englobe les paraostéoarthropathies qui sont des tumeurs osseuses extraordinairement bien organisées puisqu'elles fonctionnent comme un véritable os long en perpétuel remodelage et contenant une niche hématopoïétique [3]. Elles sont issues d'un processus d'ossification endochondral [4]. Contrairement au mot ostéome, le terme anglais « heterotopic ossification », est plus précis et lisible. On le traduit en français par « ossification hétérotopique » (OH). Il vient des racines grecques « *hetero* » et « *topos* » qui signifient « autre place » et du mot latin « *ossificatio* » se traduisant par « formation osseuse » [5–8]. La famille des OH regroupe les « paraostéoarthropathies » et les « myosites ossifiantes ». Ces dernières sont des formations osseuses non tumorales, issues d'un processus de cicatrisation selon une ossification intramembranaire conduisant à un os moins organisé et sans fonction hématopoïétique [9]. Elles n'appartiennent donc pas à la famille des « ostéomes ». De façon intéressante, il s'agit du seul terme faisant référence à l'inflammation musculaire qui, nous le verrons en fil rouge tout au long de ce travail, est plus qu'indispensable à la formation de ces ossifications ectopiques, quel que soit leur origine.

Dans ce travail, nous avons fait le choix de différencier les OH selon leur origine génétique, acquise ou idiopathique.

Ces observations sont synthétisées dans la Figure 1 qui propose une schématisation de l'ensemble des appellations, en fonction de leur définition et de leurs caractéristiques étiologiques.

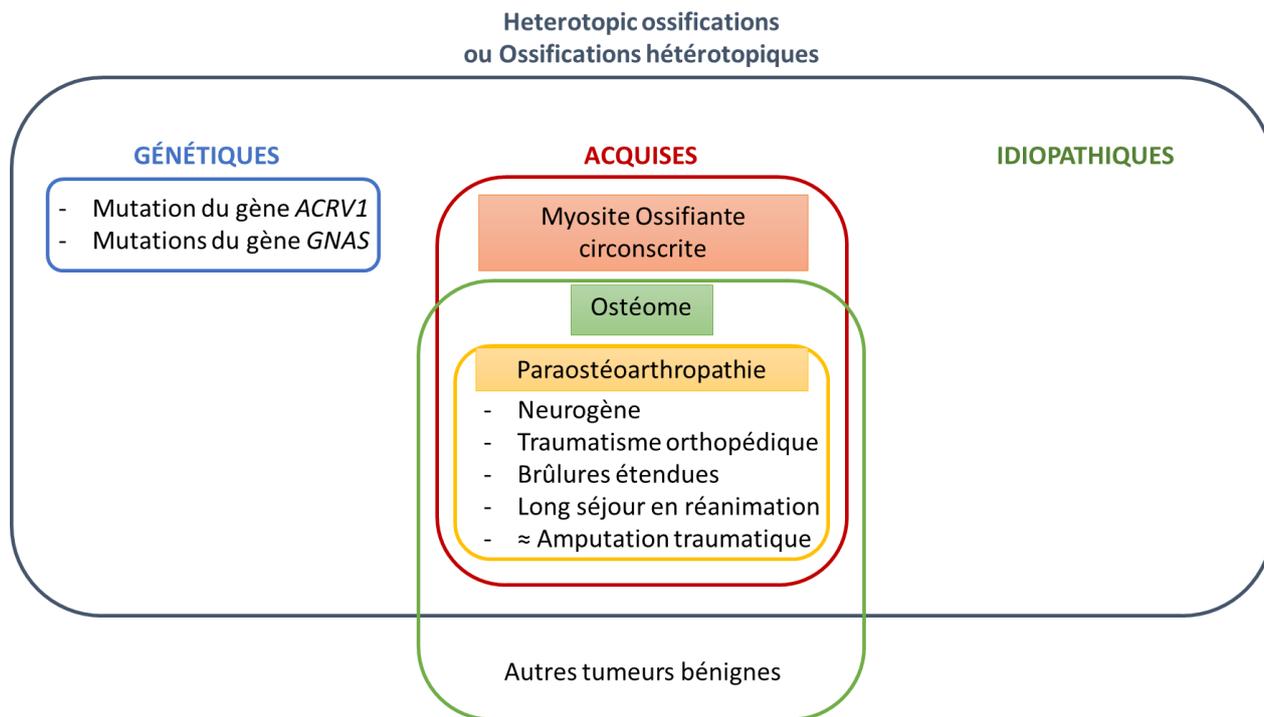


Figure 1. Schématisation de l'ensemble des appellations en fonction de leur définition et de leurs caractéristiques étymologiques.

Patin a été le premier à décrire les ossifications hétérotopiques, en 1692 chez un enfant atteint de fibrodysplasie ossifiante progressive [10]. Coppnig en 1740, puis Freke un an plus tard et enfin Riedel en 1883 ont précisé ces observations [10]. Les premières descriptions anatomo-radio-cliniques de paraostéoarthropathies (POA) ont été faites par Augusta Klumpke-Déjerine et André Ceillier en 1918, durant la première guerre mondiale chez des soldats paraplégiques après atteinte médullaire traumatique [11,12].

L'intérêt porté à ces pathologies s'est considérablement accru ces dernières années. Les formes génétiques ont suscité un attrait tout particulier. Même si elles restent rares, l'évolution rapidement tragique de ces maladies et le jeune âge des patients ont conduit à une recherche très active sur le sujet [13,14]. Les avancées majeures en matière de compréhension des mécanismes physiopathologiques et moléculaires, notamment par la multiplication des modèles animaux, ont fait émerger des thérapeutiques curatives très prometteuses. Les POA sont, quant à elles, plus fréquentes et peuvent survenir dans plusieurs pathologies acquises au cours de l'existence d'un individu. En effet, elles ont été rapportées après des traumatismes orthopédiques, des amputations traumatiques, des atteintes aiguës du système nerveux central mais aussi suite à de long séjour en réanimation ou encore des brûlures étendues [5,10,15-18]. Les remplacements articulaires prothétiques sont

particulièrement fréquents, le nombre de POA visibles en post-opératoire est par conséquent particulièrement élevé. Compte tenu du nombre de prothèses implantées chaque jour à travers le monde, un travail important c'est porté sur la recherche de mesures préventives [19]. L'apparition de POA chez des patients survivants à une lésion neurologique centrale, une brûlure étendue, une amputation ou un long séjour en réanimation pose le problème du sur-handicap dans une ère où les progrès en terme de réanimation sont constants. En effet, les POA surviennent dans des populations de patients déjà fragilisés par la pathologie initiale, ce qui prolonge la prise en charge et assombrit la récupération fonctionnelle [20,21]. L'absence de moyens préventifs efficaces et de traitements curatifs non invasifs rendent la gestion de cette complication très complexe, chez les patients les plus vulnérables. La question de l'identification des patients à risques de développer des POA, par des caractéristiques cliniques ou biologiques reste entière. De même, de nouvelles thérapies physiques ou médicamenteuses permettraient de prévenir ou de traiter les POA.

Cette thèse a pour objectif de mieux préciser les caractéristiques infectieuses et inflammatoires présentées par les patients développant des paraostéarthropathies neurogènes (POAN). Une première partie introduira les différents types d'ossifications hétérotopiques, leurs points communs, leurs différences et leurs particularités inflammatoires. Par la suite, ce travail se focalisera sur l'effet de l'inflammation et son implication dans le développement des OH neurogènes (OHN) au moyen de quatre études, deux issues de la recherche fondamentale sur un modèle murin et deux autres qui sont des études cliniques. La dernière partie développera la méthodologie de recherche employée pour la création d'une base de données clinico-biologiques chez des patients traumatisés crâniens et blessés médullaires à un stade précoce suivant l'accident neurologique. Chaque travail constituant cette thèse sera présenté dans un chapitre numéroté :

1. Effet de l'injection d'agents de paroi bactérienne et inflammation induite sur le développement des OHN chez les souris.
2. Etudier l'impact de l'injection intramusculaire de toxine botulique sur le volume des OHN dans le modèle murin : hypothèse de la modulation du signal de la JNM, notamment inflammatoire dans la formation des OHN.
3. Etudier les facteurs inflammatoires intervenant dans les processus de formation de POAN à un stade précoce suivant un traumatisme crânien chez l'Homme.
4. Etudier l'efficacité sur la douleur d'un traitement par infiltration de corticoïdes au site de développement de POAN chez l'Homme.
5. Création d'une banque de données clinico-biologiques chez des patients hospitalisés en services de soins aigus pour la recherche de marqueurs spécifiques prédictifs, notamment inflammatoires, du développement précoce de POAN chez l'Homme « BENTHOS ».

II. Les différentes formes d'ossifications hétérotopiques

1. Les formes génétiques

1.2 La fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP)

La FOP est une pathologie congénitale sévère touchant les tissus conjonctifs. Elle se caractérise par un syndrome polymalformatif et l'acquisition progressive d'ossifications ectopiques. La prévalence mondiale de la FOP est de 1 patient sur 2 millions [22]. L'origine ethnique, géographique et le genre ne sont pas corrélés au développement de FOP [23]. Les enfants naissent avec une apparence normale en dehors d'une déformation congénitale des gros orteils, une clinodactylie et une malformation du rachis cervical [24]. De façon assez typique, la première décennie de vie est marquée par des épisodes sporadiques de poussées douloureuses et inflammatoires (flare-ups) survenant dans les 24 heures après un élément déclencheur, qui peut être un traumatisme tissulaire, une injection intramusculaire, une infection virale, une chute ou encore pendant un épisode de fatigue [22]. A chaque poussée, une ossification se produit dans le tissu conjonctif et touche de façon aléatoire les muscles squelettiques, tendons, ligaments, fascias et aponévroses. Les ossifications ont généralement une progression cranio-caudale et proximo-distale [5]. La progression des ossifications à chaque poussée entraîne des plages osseuses confluentes à l'origine de raideurs articulaires des membres mais aussi du tronc et de la colonne vertébrale. La gêne fonctionnelle est majeure dans les déplacements, les gestes d'hygiène, l'installation au lit ou au fauteuil. La majorité des patients perdent la marche avant l'âge de 30 ans [22]. Le pronostic vital peut également être engagé notamment par l'atteinte des muscles péri mandibulaires qui entraîne des difficultés d'alimentation orale et un amaigrissement [22]. La croissance des ossifications impliquant la paroi thoracique, conduisent au développement d'un syndrome thoracique restrictif à l'origine d'une insuffisance cardio-pulmonaire et cause la mort vers 40 ans [25,26].

Le diagnostic est clinique et confirmé par des tests génétiques. La FOP est due à des mutations ponctuelles dans la partie codante du gène de l'Activin A receptor type I (*ACVR1*) aussi appelé activin receptor like kinase-2 (*ALK2*) sur le chromosome 2q23-24. Le gène *ACVR1* code pour un récepteur serine kinase du même nom (*ACVR1* ou *ALK2*) appartenant à la famille des récepteurs à la « bone morphogenetic protein » (BMP) de type I [27]. Les mutations causant la FOP les plus fréquentes transforment une arginine en position 206 du récepteur en une histidine (R206H) ou bien une glycine en position 617 en alanine (G617A). D'autres mutations ponctuelles et activatrices du gène *ACVR1* ont été plus rarement rapportées telles que la mutation L196P [28]. Toutes les mutations causant la FOP ont la caractéristique d'activer la fonction kinase du récepteur indépendamment de la liaison de ses ligands physiologiques (BMP). Elles ont une pénétrance de 100% cependant la vitesse de développement et la sévérité des OH sont très variables entre les individus affectés par ces mutations. Elles sont le plus souvent somatiques et sporadiques mais des formes héréditaires autosomiques dominantes ont également été rapportées [27]. De façon physiologique, le récepteur *ACVR1* sauvage

lie les BMP qui l'activent et conduisent à la phosphorylation et activation des Smad 1/5/8 (Figure 2.B). L'activine A a également la capacité de se lier au récepteur ACVR1 mais est antagoniste du signal des BMP car la liaison de l'activine A entraîne la phosphorylation et l'activation des Smad 2/3 (Figure 2.A et C) [29]. En revanche, chez les patients atteints de FOP, la mutation R206H change la spécificité du récepteur ACVR1. L'activine A devient alors agoniste, entraînant une hyperactivation du récepteur ACVR1^{R206H} conduisant à la phosphorylation et activation de Smad 1/5/8 au lieu de Smad 2/3 (Figure 2.D) [29].

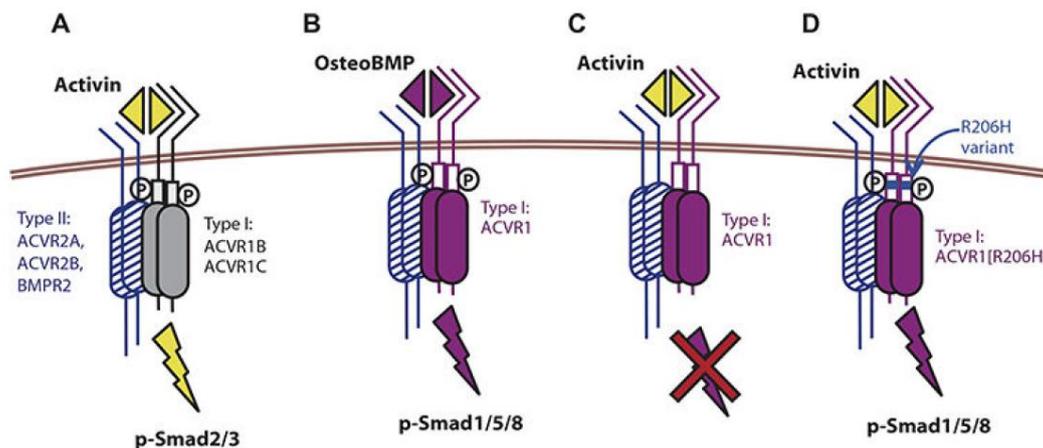


Figure 2. Un changement d'acide-amino du domaine intracellulaire (R206H) transforme ACVR1 en un récepteur répondant à l'activine et entraîne la stimulation de la voie de signalisation Smad 1/5/8.

(A) L'activine se lie de façon physiologique au récepteur Activine ACVR1B/1C de type 1 et active la voie de signalisation Smad2/3 et partage le récepteur de type II (ACVR2A, ACVR2B, and BMPR2) avec les BMPs. (B) les récepteurs ACVR1 et de type II reconnaissent les BMPs et stimulent la phosphorylation de Smad1/5/8. (C) les récepteurs ACVR1 et de type II se lient avec l'activine mais le complexe résultant de cette lésion ne permet pas la stimulation et phosphorylation de Smad1/5/8 ; à la place, l'activine agit comme un inhibiteur du signal des BMPs via le récepteur ACVR1. (D) Dans la FOP, la variante R206H du récepteur ACVR1 répond à l'activine, induisant la phosphorylation de Smad1/5/8, tout comme les BMP. La variante R206H ne perd pas son habileté à la réponse canonique par stimulation du récepteur par les BMP. Schéma extrait de l'article de Hatsell et coll. [29]

Récemment, Alessi Wolken et collaborateurs ont confirmé via l'utilisation d'un modèle animal, l'importance de l'Activine A. Ils ont aussi souligné la nécessité du déclenchement des poussées inflammatoires par des facteurs extrinsèques pour induire la formation d'os ectopique. En effet la simple mutation du récepteur ACVR1 ne suffit pas à la progression de la maladie [30]. Suite à la stimulation du récepteur, l'emballement de la voie de signalisation sous-jacente, mène à la formation d'os ectopique selon un processus d'ossification endochondrale [30]. A ce jour, il n'y a aucun traitement préventif ou curatif de la FOP [22,26]. La prise en charge repose essentiellement sur la prévention des poussées inflammatoires par l'éviction de tout traumatisme, injection, infection et chute. Un traitement par corticoïdes ou anti-inflammatoires non stéroïdiens est instauré dans les 24 heures suivant le début d'une poussée pour une durée de 4 jours. Cependant, les progrès de la recherche

fondamentale en terme de compréhension des mécanismes physiopathologiques, font émerger des traitements dont certains font actuellement, l'objet d'essais thérapeutiques [26]. Le Palovarotene est un dérivé de l'acide rétinoïque qui agit comme un antagoniste à la chondrogénèse. Deux essais thérapeutiques de phase II et III sont actuellement en cours. L'anticorps anti-activine A (REGN2477) qui permet de neutraliser l'Activine A avant sa liaison au récepteur muté ACRV1, est actuellement testé dans un essai clinique de phase II. La Rapamycine est un immunosuppresseur déjà connu et fréquemment utilisé dans les suites de greffes d'organes. Ce traitement agit en bloquant la « mechanistic target of rapamycin complex 1 » (mTORC1) et permet de réduire la taille des OH dans la FOP en agissant sur une des voies de signalisation activée par l'activine A. Un essai clinique de phase III est en cours. D'autres traitements tel que l'Imatinib et le Saracatinib, deux inhibiteurs de tyrosine kinases font également l'objet de pistes thérapeutiques [26]. Contrairement aux autres formes d'OH, la chirurgie est contre-indiquée car elle déclenche généralement les poussées inflammatoires et risque donc d'aggraver la maladie.

1.3 Maladies génétiques issues de mutations hétérozygotes inactivatrices du gène *GNAS*

L'hétéroplasie osseuse progressive (HOP), l'ostéodystrophie d'Albright (OHA), pseudohypoparathyroïdisme (PHP), pseudo- pseudohypoparathyroïdisme (PPHP) et primary osteoma cutis (POC) sont des maladies génétiques très rares qui partagent des caractéristiques similaires d'ossifications ectopiques des tissus conjonctifs superficiels en association avec des mutations hétérozygotes inactivatrices du gène *GNAS* (Tableau 1) [31].

Le gène *GNAS1* (Guanine Nucleotide-binding protein Alpha Stimulating) situé à l'extrémité distale du chromosome 20 présente une organisation complexe responsable de la synthèse de 5 transcrits différents d'expression monoallélique maternelle ou paternelle sous le contrôle de régions différenciellement méthylées [32].

Gsa code pour la sous-unité α stimulatrice des protéines G, cruciale pour l'activation de la voie de signalisation de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) comme le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la thyroid-stimulating hormone (TSH). Dans certains tissus comme le tubule rénal proximal (cible de la PTH), la thyroïde ou l'hypophyse, l'expression de Gsa est monoallélique, d'origine maternelle et soumise à l'empreinte parentale de façon tissu-spécifique [32]. Les défauts génétiques et épigénétiques du locus *GNAS* causent en fonction de leur origine allélique, différentes pathologies syndromiques hétérogènes (Tableau 1). La distinction clinico-biochimique entre ces différentes pathologies se fait principalement sur la présence ou non du syndrome dysmorphique, l'OHA, et la présence d'une résistance hormonale en particulier à la PTH. Ainsi des lésions génétiques du locus *GNAS* sont associées à plusieurs phénotypes qui dépendent d'une part du site de la lésion (centre d'empreinte ou région codante) et d'autre part de l'allèle atteint (maternel ou paternel) [32].

Dans ces pathologies, la formation d'os ectopique débute dès le plus jeune âge et se fait essentiellement selon un processus d'ossification intramembranaire, quelques îlots cartilagineux peuvent toutefois être présents [5]. Les ossifications se développent préférentiellement dans les tissus superficiels, cutanés et sous cutanés. Dans la HOP, les formations osseuses s'étendent également en profondeur vers les muscles, tendons et fascias, contrairement aux autres formes génétiques avec mutation du gène *GNAS1* [33]. La HOP se différencie de la FOP par l'absence de malformation ou de poussées inflammatoires. Le diagnostic est confirmé par l'analyse du génome retrouvant une mutation inactivatrice hétérozygote de *GNAS1* et une absence de syndrome de résistance à la parathormone (Tableau 1) [31,33]. L'OHA se caractérise par l'addition de plusieurs symptômes cliniques tel qu'une petite taille, obésité, face ronde, bradycardie et déficience cognitive [34]. Les patients atteints de PHP présentent plusieurs symptômes similaires à l'OHA et un syndrome de résistance à la parathormone (Tableau 1) [35]. Dans l'OC, les ossifications sont toujours superficielles, il n'y a pas de critères cliniques communs à l'AHO ni de syndrome de résistance à la parathormone [36].

Abréviation	nom	Syndrome d'OHA ¹	Observations biologiques	Activité biologique de la protéine G	Chromosome/gène	Anomalie moléculaire
PHP1a²	Pseudo-hypoparathyroïdie 1a	+++	Résistances hormonales multiples (PTH, TSH, Gonadotrophines)	Diminuée	20q13.32/ <i>GNAS</i>	Mutation hétérozygote inactivatrice de la séquence codante du gène <i>GNAS</i> portée par l'allèle maternel
PPHP	Pseudo-Pseudo-hypoparathyroïdie	+++	Pas de résistance hormonale	Diminuée	20q13.32/ <i>GNAS</i>	Mutation hétérozygote inactivatrice de la séquence codante du gène <i>GNAS</i> portée par l'allèle paternel
HOP	Hétéroplasie osseuse progressive	+/-	Pas de résistance hormonale	Diminuée	20q13.32/ <i>GNAS</i>	Mutation hétérozygote inactivatrice de la séquence codante du gène <i>GNAS</i> portée par l'allèle paternel
PHP1b³	Pseudohypoparathyroïdie 1b	+/-	Résistance hormonale: PTH+/-TSH	Normale (ou légèrement diminuée)	20q13.32/ <i>GNAS</i>	Perte de l'empreinte parentale du locus <i>GNAS</i>
PHP1c	Pseudohypoparathyroïdie 1c	+++	Résistances hormonales multiples (PTH, TSH, Gonadotrophines)	Normale in vitro	20q13.32/ <i>GNAS</i>	Mutation hétérozygote inactivatrice dans l'exon 13 de <i>GNAS</i> porté par l'allèle maternel: perte de couplage RCPG-AC

Tableau 1. Caractéristiques distinctives des pathologies liées à des défauts génétiques et épigénétiques du locus *GNAS*.

Tableau extrait du l'article de Linglart et coll.[32] ¹ (+++) syndrome d'OHA marqué, (+/-) syndrome d'OHA peu marqué.

Comme pour la FOP, il n'existe pas de traitement permettant de prévenir ou de traiter ces pathologies. Les processus d'ossification et les voies de signalisation étant différents entre les maladies génétiques avec mutation de *GNAS* (intramembranaire) et la FOP (endochondral), les thérapeutiques en cours de développement dans la FOP ne s'appliquent pas ici. La chirurgie d'exérèse reste la seule alternative lorsque les formations osseuses sont volumineuses et fonctionnellement gênantes avec toutefois, un

risque de récurrence [33].

2. La myosite ossifiante circonscrite

La myosite ossifiante est une prolifération hétérotopique non néoplasique d'os au sein des structures musculaires. C'est une lésion bénigne, rare, représentant 0.7% des ossifications des parties molles [37]. Le terme de myosite est cependant inapproprié car l'ossification ne provient pas des fibres musculaires striées squelettiques mais du tissu conjonctif interstitiel [38]. La myosite ossifiante circonscrite (MOC) est attribuée à un traumatisme dans 60 à 75% des cas ou à des microtraumatismes répétés [39]. Cependant il n'est pas toujours possible de la rattacher à un traumatisme connu, il s'agit de formes apparemment spontanées, appelées myosite ossifiante circonscrite non traumatique [40]. Ces ossifications se développent généralement à la racine de membres, autour des ceintures pelviennes et scapulaires, peuvent intéresser les cuisses ou les bras. Elles apparaissent parfois plus en distalité dans les mains et les pieds. Elles intéressent plutôt la partie antérieure du corps humain [41]. L'atteinte des muscles para vertébraux est très rarement décrite [42].

La MOC survient de façon préférentielle chez l'adulte jeune. Elle se manifeste initialement par l'apparition brutale d'une masse douloureuse et inflammatoire des parties molles. Le volume de la tuméfaction est d'emblée maximal puis diminue progressivement pour se normaliser à la phase chronique [43]. L'aspect radiologique se modifie parallèlement à l'évolution clinique et histologique de la lésion [44]. A la phase initiale, les radiographies standard ne décèlent généralement aucune anomalie. En revanche, l'échographie peut être utile et mettre en évidence des modifications de l'échogénicité du muscle et de vascularisation mais sans aucune spécificité [9, 10]. La TDM (tomodensitométrie) objective à ce stade, une tuméfaction des parties molles mal limitée, se rehaussant après injection de produit de contraste et respectant l'os adjacent. En IRM, la masse apparaît en isosignal T1, en hypersignal T2 hétérogène, faiblement rehaussée après injection de gadolinium, avec un œdème musculaire extensif dépassant les limites de la tuméfaction [45]. Cet aspect œdémateux des muscles peut faire évoquer également un abcès, un hématome ou la rhabdomyolyse d'où la nécessité d'une confrontation clinico-biologique et radiologique [46]. Progressivement, la lésion s'ossifie devenant visible sur les radiographies standard et en TDM. Elle se traduit d'abord par des opacités floconneuses puis évolue vers un os mature à la périphérie de la masse. Parfois la masse est totalement calcifiée et cette ossification peut arriver au contact de l'os [47]. En cas de doute diagnostique, la répétition d'examen d'imagerie suffit souvent à élucider le diagnostic et permet ainsi d'éviter une biopsie chirurgicale [9]. L'analyse histologique n'est indiquée que lorsque l'évolution et l'aspect radiologique de la lésion sont atypiques. Sur le plan histologique, la myosite ossifiante évolue selon trois phases caractéristiques et suivant un processus d'ossification intramembranaire. Au cours de la première semaine, il existe une prolifération active mésenchymateuse. Lors de la deuxième semaine, des ostéoblastes vont se loger au sein du tissu

conjonctif et entament la production d'une matrice ostéoïde qui conduit à la formation d'une capsule fibreuse. Dans les deux à huit semaines suivantes, se constitue un « phénomène de zone », avec trois zones distinctes. La zone centrale est constituée de tissu mésoenchymateux, hémorragique et nécrotique, la zone intermédiaire présente des ostéoblastes, et des îlots d'os immature, et la zone externe contient des travées d'os mature. L'ossification se fait de façon centripète [43]. Par ailleurs, l'analyse histologique peut être trompeuse et doit être faite sur un volume suffisant de la masse pour retrouver le phénomène de zone (tissu mésoenchymateux - ostéoblastes et îlots d'os immature - travées d'os mature). Dans le cas contraire, le diagnostic de tumeur maligne peut être porté, à tort [46,47]. L'évolution de la myosite ossifiante circonscrite se fait vers la stabilisation, la régression ou la disparition de la lésion [48]. La dégénérescence sarcomateuse semble exceptionnelle lorsque le diagnostic initial de MOC est avéré [37]. L'abstention thérapeutique est la règle. La chirurgie n'est indiquée uniquement dans les cas symptomatiques et gênant la fonction [49].

3. Les paraostéopathies

3.1 Leurs points communs

Si l'étiologie des POA acquises diffère d'un patient à l'autre, on retrouve dans la littérature, un certain nombre de points communs entre les POA survenant après traumatismes orthopédiques, amputations, brûlures étendues, hospitalisation prolongée en réanimation et atteinte aiguë du système nerveux central (SNC) (Tableau 2).

3.1.1 Localisations péri-articulaires

Dans les études cliniques dont le design est très souvent rétrospectif, les sites les plus fréquemment cités sont également les plus opérés car ils représentent les localisations articulaires gênantes. Les POA sont habituellement localisées autour des grosses articulations que sont la hanche, le genou, le coude et l'épaule. Toutefois, quelques cas ont été rapportés avec un développement distal.

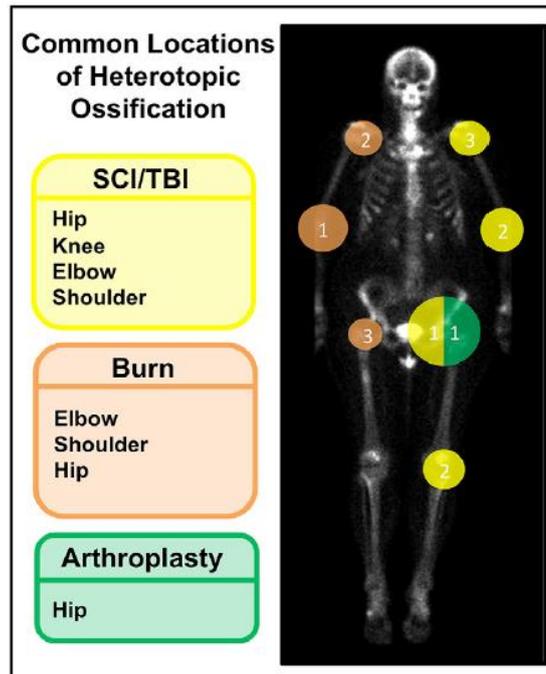


Figure 3. Localisations des POA en fonction de la pathologie initiale.

La numérotation va de 1 (site le plus fréquent) à 3 (site le moins fréquent) en fonction de la localisation péri-articulaire des POA et de la maladie d'origine. Image provenant de l'article de Ranganathan et coll.[17].

Il existe des sites préférentiels selon la pathologie initiale.

Le cas des amputations est un peu particulier car les POA sont localisés dans les tissus mous de l'extrémité du moignon. L'appellation POA est d'ailleurs un abus de langage car l'ossification néoformée ne se situe pas autour d'une articulation mais plutôt entre l'os sectionné et le matelas musculo-cutané suturé. Cependant, au vue de son développement clinique et de ses caractéristiques histologiques, nous préférons le classer dans les POA [7,8]. La classification de Walter Reed (Figure 4) permet de distinguer les POA apparaissant suite à des amputations traumatiques selon leur volume.



Figure 4. Classification de Walter Reed.

Grade 1 ou mineur, POA dont la taille est < à 25% de la surface des tissus mous du moignon. Grade 2

ou modéré, POA dont la taille se situe entre 25 et 50% de la surface des tissus mous du moignon. Grade 3 ou sévère, POA dont la taille est > à 50% de la surface du moignon. Photo extraite de l'article de Forsberg et Potter [50].

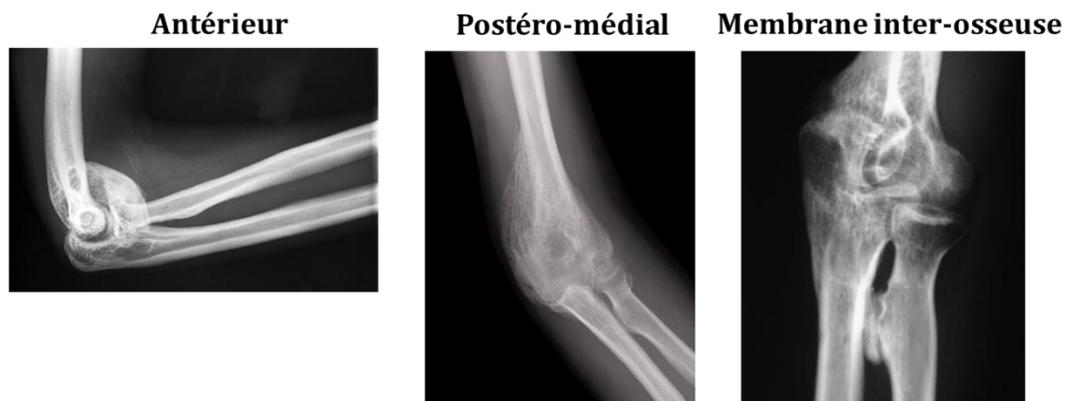


Figure 5. Différentes localisations de POA autour du coude.

Localisations antérieure et postéro-médiale par rapport à l'articulation du coude et POA de la membrane inter-osseuse.

Le coude est la localisation la plus fréquente de développement de POA chez les sujets victimes de brûlures étendues [17]. Dans leur cohorte, Medina et coll. observaient 60% de POA autour du coude, 10% étaient localisés à l'épaule et 7% étaient proches des os de l'avant-bras ou localisés à la face interne du genou [16]. Certains auteurs rapportent également des POA en regard des articulations temporo-mandibulaires, lorsque les brûlures s'étendent jusqu'à la face [51]. Il est à noter que cette complication ne se situe pas toujours en regard d'une zone brûlée et peut se former autour d'articulations situées en regard de zones de peau saine [52]. La moitié des patients atteints de POA au coude présentent une atteinte bilatérale [53,54]. Les POA peuvent avoir différentes localisations autour du coude et être à l'origine de symptômes plus ou moins gênants (Figure 5). Environ 12% des POA seraient à l'origine d'une compression aiguë du nerf ulnaire dans sa gouttière lorsqu'ils sont situés à la face postérieure du condyle médial [6]. Certains ont une localisation antérieure par rapport à l'articulation ce qui entraîne une raideur articulaire en flexion, alors que d'autres se développent dans la portion proximale de la membrane interosseuse et altèrent les capacités de pronosupination. Plusieurs auteurs ont tenté d'expliquer cette localisation préférentielle des POA au coude chez les grands brûlés. Certains suggèrent que la position prolongée en décubitus dorsal chez des patients immobiles, bras en extension et avant-bras en supination provoque un hyper-appui sur la zone postérieure du coude où peut ensuite se développer les POA [55]. Pour Levi et coll. c'est la compression du nerf ulnaire par cette même installation dans le lit qui induirait des mécanismes de neuro-inflammation conduisant à la formation de POA dans cette zone [56]. Plus simplement, on peut aussi suggérer que les patients sont plus fréquemment brûlés aux membres supérieurs expliquant la localisation préférentielle des POA au coude.

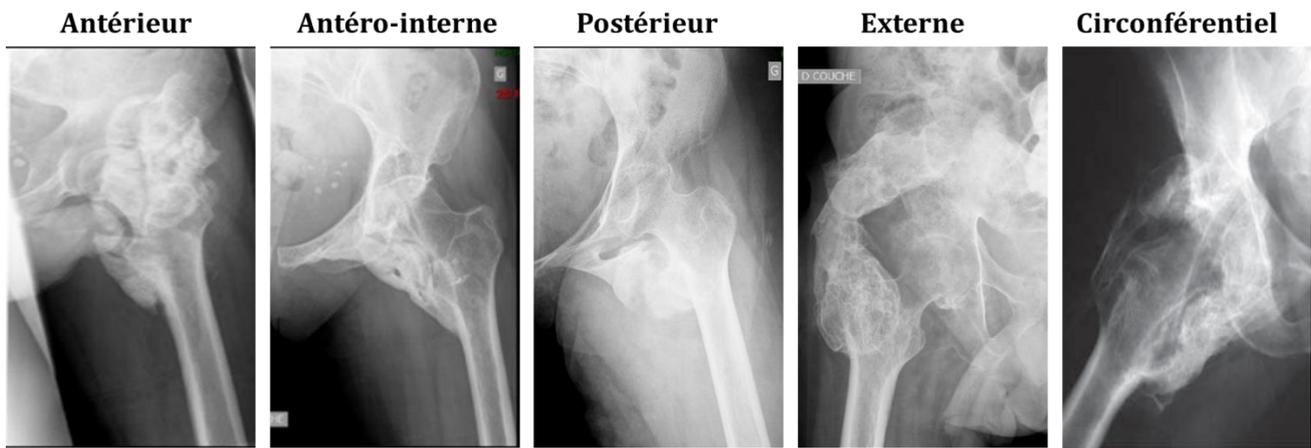


Figure 6. Différentes localisations de POA autour de la hanche sur des radiographies.

Antérieur : base d'implantation proximale sur les épines iliaques antéro-supérieure et inférieure, face interne de la fosse iliaque et partie externe de la branche ilio pubienne, base d'implantation distale sur la face antérieure de l'extrémité supérieure du fémur, englobe en général le petit trochanter jusqu'à sa face postérieure ; Antéro-interne : base d'implantation proximale sur la branche ilio-pubienne, implantation distale sur la face médiale de l'extrémité supérieure du fémur, englobe le petit trochanter et peut descendre sur la diaphyse fémorale ; Postérieure : base d'implantation proximale sur la tubérosité ischiatique, s'étend le plus souvent d'arrière en avant, recouvrant la moitié de la face supérieure du col, base d'implantation distale sur le bord postérieur du grand trochanter ; Externe : base d'implantation proximale sur la crête iliaque, au sein des muscles fessiers, base d'implantation distale sur le petit trochanter ; Circonférentiel : association des localisations précédentes.

Dans les séries concernant les POAN, c'est la hanche qui arrive en première position avec 60% des localisations, suivi par le coude (20%) puis le genou (15%) et enfin l'épaule (5%) [17,57-59]. Le diagnostic de POA au genou ou à l'épaule est généralement tardif sauf s'il existe une fracture associée [20]. Le développement des POAN se fait généralement en zone paralysée et donc de façon paradoxale, en milieu de perte osseuse [60]. Cependant, il existe, comme chez les brûlés, des POAN se formant à distance des zones déficitaires et qui sont souvent contemporaines d'un traumatisme local associé [58]. Les patients après traumatisme crânien présentent en moyenne 2 à 3 POAN, alors que la moitié des blessés médullaires (BM) traumatiques développent au moins 2 POAN [61,62]. Les POAN de hanches sont tout aussi fréquents chez les TC que les BM mais aussi après accident vasculaire cérébral (AVC). De façon intéressante, une étude récente de Grelier et coll. rapporte une spécificité de la localisation autour de l'articulation de la hanche en fonction de l'étiologie neurologique (non publié). Ainsi, la disposition antéro-interne semble être plus fréquente chez les cérébrolésés (AVC et TC) alors que les BM ont une localisation plutôt antérieure (Figure 6). Enfin, la localisation postérieure est d'avantage rencontrée chez les TC. Comme pour le coude, la localisation postérieure de POAN de hanche peut entraîner une compression nerveuse périphérique. Dans une cohorte de 116 patients ayant bénéficié d'une résection de POAN postérieurs de hanche, nous avons observé que la moitié d'entre eux avait

également nécessité une neurolyse chirurgicale du nerf ischiatique, soulignant le caractère largement sous-diagnostiqué de cette complication [63]. Les différentes localisations des POAN autour de la hanche pourraient s'expliquer par les variations de contraintes mécaniques qui s'exercent autour de l'articulation. En effet, les patients cérébrolésés après avoir passé un long moment en décubitus dorsal lors de leur séjour en service de soins aigus, récupèrent généralement des capacités motrices et fonctionnelles, de verticalisation voire de marche, alors que les patients BM sont très rapidement installés au fauteuil. La chirurgie d'exérèse étant dirigée vers les POAN fonctionnellement gênants, une autre hypothèse consiste à penser que le site de résection des POAN est différent selon que le patient soit cérébrolésé ou BM. Les BM ont pour objectifs d'être installés correctement au fauteuil et d'effectuer leurs transferts en sécurité. On comprend logiquement qu'un POAN de localisation antérieure altère les capacités fonctionnelles de ces patients. Quant aux patients cérébrolésés, les POAN responsables de raideur articulaire ou comprimant le nerf ischiatique seront réséqués de façon à permettre la verticalisation ou la marche. D'après Garland et coll, l'hypertonie spastique pourrait également jouer un rôle dans la localisation préférentielle des POAN autour des articulations [64]. Ils ont émis l'hypothèse que l'emplacement exact des POAN par rapport au coude dépendrait de la présence de spasticité des muscles fléchisseurs ou extenseurs de coude. Une spasticité des fléchisseurs entraînerait, selon eux, une localisation antérieure des POAN, alors qu'une spasticité du triceps favoriserait les localisations postérieures [64].

La disposition des POA autour du genou se fait généralement au contact du ligament collatéral interne (LLI). Une fois de plus, cette localisation est majoritairement prise en charge en cas de gêne importante. De par son développement au contact du LLI, la POA empêche son glissement le long du condyle fémoral interne lors du mouvement de flexion, ne permettant pas toujours une amplitude articulaire satisfaisante et est parfois source de douleur (voir Chapitre 4). Il existe également des POA se développant en arrière du genou, dans le creux poplité.

Concernant l'épaule, les POAN se localisent généralement au-dessus de l'articulation gléno-humérale. L'épaule comme le genou sont des localisations moins opérées car moins gênante et donc généralement diagnostiqué tardivement. En effet, le développement de POA autour du complexe de l'épaule comme du genou permet souvent de conserver des amplitudes articulaires fonctionnelles.

3.1.2 Symptômes cliniques

Les premiers symptômes cliniques de POA apparaissent entre 15 jours et 3 mois suivant la déclaration de la pathologie initiale [5,6,10,65]. A la phase précoce, ils correspondent aux signes inflammatoires locaux : érythème, augmentation de la chaleur locale, tuméfaction [5,6,17]. La douleur est la première manifestation clinique chez les patients ayant conservé la sensibilité [60,66]. On peut également constater l'apparition d'une raideur articulaire [10,20]. Les patients présentent parfois des signes

inflammatoires généraux tel qu'un fébricule ou un syndrome inflammatoire biologique. A ce stade, les symptômes sont peu spécifiques et peuvent mimer un tableau infectieux (cellulite, ostéomyélite, arthrite) ou bien inflammatoire (syndrome douloureux régional complexe, masse tumorale, thrombose veineuse profonde). Les examens complémentaires effectués cherchent en premier lieu, à éliminer d'autres pathologies graves et urgentes chez des patients fragilisés, présentant parfois un pronostic vital engagé. En effet, la priorité chez les patients qu'ils soient brûlés, amputés, neurolésés ou en réanimation est aux soins d'urgence fonctionnelle mais aussi vitale, ce qui diffère logiquement le diagnostic de POA. De plus, la mauvaise corrélation radio-clinique, ne permet pas toujours de faire un diagnostic précoce.

Après 3 à 6 mois d'évolution, les signes inflammatoires font place à des symptômes mécaniques : douleur, raideur articulaire pouvant évoluer jusqu'à l'ankylose [5,6,10,17,67]. La tuméfaction initiale laisse place à un œdème induré, une masse peut parfois être palpée [68]. Dans le cadre des POAN, l'ankylose surviendrait chez environ 15% des patients dans les suites d'une atteinte du SNC [61,64,66]. C'est régulièrement à un stade avancé où surviennent des complications et lorsque le retentissement fonctionnel est important que le diagnostic de POA est confirmé. L'évolution de la POA peut donner lieu à des compressions artérielles, veineuses ou encore, des troncs nerveux périphériques comme évoqué pour le nerf ulnaire au coude et le nerf ischiatique à la hanche [10,67,69].

Concernant les compressions veineuses, l'œdème inflammatoire provoqué initialement par le développement d'une POA peut être responsable d'un effet de masse sur les vaisseaux. De même, à un stade plus évolué de maturation, les volumineux POA peuvent refouler les structures vasculaires, à l'origine d'une compression dynamique par collapsus veineux, lors des mouvements du patient [70]. Ces phénomènes peuvent entraîner un œdème et une hyperhémie du membre sous-jacent. Dans 5% des cas, ce sont des manifestations thromboemboliques qui révèlent les POA [70]. Perkash et coll. expliquent que les thromboses veineuses peuvent être potentialisée par un état d'hypercoagulabilité présent à la phase aiguë du développement des POA [71]. Une fois cette phase passée, les facteurs de coagulation diminuent progressivement puis finissent par se normaliser [71]. Une imagerie vasculaire pourra dans ce cas, mettre en évidence des signes de compressions. Les compressions artérielles sont exceptionnelles grâce à leurs parois moins déformables.

Les escarres secondaires à la présence de POA sont rares. Ils peuvent entraîner des zones d'hyper-appuis, soit par contact direct entre la POA et les tissus mous, soit par l'intermédiaire d'une position vicieuse articulaire entraînant des points d'hyper-appuis lors de l'installation au lit ou au fauteuil [20].

Les POA peuvent continuer leur évolution jusqu'à 1 an suivant le début de la pathologie initiale [20]. Leur taille finit ensuite par se stabiliser. Cependant, la découverte de cette complication est parfois plus tardive. La présence de POA, nous l'avons vu, peut entraîner des symptômes et des sur-

complications qui vont venir s'ajouter au tableau initial et à terme, entacher la rééducation et retarder la récupération clinique et fonctionnelle. Il est donc recommandé de faire le diagnostic le plus précocement possible et ce, avant la survenue de complications [63,72].

3.1.3 Signes radiologiques

Comme nous venons de le voir, les symptômes cliniques de POA permettent de suspecter le diagnostic. Toutefois, seul les examens d'imagerie permettront de confirmer la présence de POA et d'en déterminer les caractéristiques (taille, localisation, rapport avec les autres structures anatomiques). L'apparition des POA est parfois très silencieuse ou peut être masquée par la gravité des pathologies associées, ce qui conduit à des difficultés diagnostiques [60]. Dans ces situations, la découverte de POA est parfois fortuite. C'est ce qui explique, d'ailleurs, que la prévalence radiologique soit supérieure à la prévalence clinique.

Les radiographies standard sont réalisées en première intention. Les déformations orthopédiques observées après lésion neurologique centrale sont principalement musculo-tendineuses. Cependant, devant une limitation de mobilité articulaire, il faut savoir éliminer une cause «articulaire» dont la présence d'une POA [73]. Il aidera également à écarter un diagnostic différentiel, par exemple, une fracture passée initialement inaperçue.

Les POA se manifestent sous forme d'opacités péri-articulaires et sont rarement visibles avant la troisième semaine de développement [20]. Généralement, elles apparaissent entre 7 et 9 semaines suivant la lésion initiale. Parfois, on peut deviner un œdème des parties molles avant l'apparition d'ossifications. La réalisation de nouvelles radiographies à distance est souvent nécessaire pour mettre en évidence cette complication (figure 7) [74].

Typiquement, les symptômes précèdent l'apparition de signes radiologiques. On dit qu'il y a à la phase initiale de développement de POA, une mauvaise corrélation radio-clinique. Nous allons voir qu'il existe des imageries à privilégier en fonction du stade de maturation des POA.



Figure 7. Evolution radiologique sur radiographie standard, de POA de hanche au cours du temps.

A 1 mois, la POA n'est pas visible. A 3 mois, POA en cours de constitution, correspondant à des opacités

floconneuses péri-articulaires visibles autour de la hanche. A 12 mois, POA bien constituée, correspondant à une opacité osseuse péri-articulaire de hanche.

Face à une forte suspicion clinique et des radiographies normales, le choix de l'examen réalisé va essentiellement dépendre de son accessibilité. En effet, on préférera généralement l'échographie qui est plus facilement réalisable, accessible, moins irradiante et peu coûteuse chez des patients encore hospitalisés pour des soins aigus, agités, confus ou inconfortables [75,76]. L'inconvénient de l'échographie est qu'il est opérateur dépendant et donc à ce stade, les opérateurs sont généralement capables d'écarter un diagnostic différentiel (fracture, phlébite) mais pas toujours de faire un diagnostic de POA avec certitude [77]. Amar et coll. rapportent une bonne sensibilité et spécificité de l'échographie pour le diagnostic de POA dès 15 jours post implantation de PTH [76]. Les signes échographiques apparaîtraient 10 à 15 jours avant les opacités visibles sur les radios standards [76]. Les images visibles à la phase initiale sont un œdème intramusculaire, une augmentation du signal doppler témoignant d'une hypervascularisation [75,76]. Perovsky et coll. sont plus contrastés quant à l'utilisation de l'échographie. Si cet outil permet de faire un diagnostic précoce, il ne permet pas de suivre l'évolution des POA et distinguer les différentes phases de maturation des POA [77].

Une IRM pourrait être proposée pour un diagnostic précoce mais pose le problème de délais d'obtention de l'examen, du temps de réalisation et des difficultés d'accessibilité chez des patients encore en cours de soins intensifs ou présentant des contre-indications à l'examen. L'IRM est capable de déceler des anomalies de signal en rapport avec la formation des POA dès le 2^{ème} jour suivant l'apparition des symptômes [78]. Les séquence STIR permettent de visualiser très précocement des images caractéristiques évoquant le diagnostic de POA : un œdème interstitiel, un épaissement des tissus conjonctifs intramusculaires, un épanchement articulaire et un aspect en dentelle du muscle [20,78].

La tomодensitométrie permet de faire le diagnostic dans les deux semaines suivant l'apparition des symptômes et donc avant la radiographie [20]. Lorsqu'elle est couplée à une injection de produit de contraste, c'est aussi l'examen de choix pour évaluer les risques opératoires et les rapports anatomiques des POA avant la chirurgie. En effet, elle apporte des informations concernant la densité osseuse et la qualité de l'articulation sous-jacente à la POA [72,79], mais aussi sur les rapports entre POA et les structures vasculaires adjacentes, après reconstruction des acquisitions en 3 dimensions. Tous ces éléments permettront au chirurgien de choisir la voie d'abord idéale pour l'exérèse de la POAN [79,80].

La scintigraphie osseuse au technétium Tc-99m avait été proposée il y a plusieurs années comme une méthode de détection précoce et de suivi de maturation de POA avant chirurgie [81]. Nous savons aujourd'hui qu'il n'est plus raisonnable de proposer cet examen devant un nombre important de faux positifs en phase initiale de développement de POA. Ceci peut s'expliquer par la présence, chez les patients susceptibles de développer des POA, de nombreux foyers d'inflammation ou d'infections en lien avec la pathologie initiale [77]. Par ailleurs, Genêt et coll. ont montré qu'une chirurgie précoce

peut être proposée dès la première année d'évolution sans risquer d'augmenter le risque de récurrence [57], permettant ainsi d'éviter l'évolution vers l'ankylose et la survenue de complications (lésions intra-articulaires, déminéralisation osseuse avec risque fracturaire peropératoire) [72]. Cependant, lorsque la scintigraphie est couplée au scanner (SPECT-CT), la spécificité augmente et permet de faire un diagnostic de certitude [82].

Un nouveau système d'imagerie par radiations proches des infrarouges (NIR) a été utilisé par l'équipe de Perosky et coll. Ils ont montré sur un modèle murin, la capacité de cet outil à détecter les POA de façon précise et constante. Ce système par radiation proche des infrarouges peut également assurer par la suite, un suivi de la croissance des ossifications ectopiques [77].

De façon similaire à la technique précédente, la spectrométrie RAMAN a été étudiée chez l'animal puis chez l'homme, pour diagnostiquer les POA de façon précoce et non invasive, avec des résultats assez prometteurs [83].

3.1.4 Paramètres biologiques

Plusieurs paramètres biologiques ont été étudiés pour aider au diagnostic ou dans le suivi de la maturation des POA.

Le taux de phosphatase alcaline (PAL) sérique est augmenté au cours de l'ostéogénèse. Il est logique de penser que son dosage pourrait aider au dépistage précoce de développement de POA. Cependant, son augmentation n'est ni constante, ni spécifique et n'apporte aucune précision sur la maturité des POAN [20,67,84].

D'autres marqueurs ont été étudiés tels que la prostaglandine E2 (PGE2), Créatine Phospho-kinase, l'excrétion d'hydroxyproline urinaire sur les urines des 24 heures, de glycoprotéines [10,62].

Aucun marqueur biologique n'a, à ce jour, été identifié comme contribuant au diagnostic de POA ou permettant de déceler les patients à risque [6].

Ces dosages n'ont par conséquent aucune indication en pratique clinique actuellement.

3.1.5 Méthodes de préventions

a) Prise en charge adéquate des facteurs de risque

La prévention primaire consiste, tout d'abord, en la prise en charge adéquate des facteurs de risque (admission en centre spécialisé et mobilisation passive précoce) et des facteurs confondant (escarres, retard de cicatrisation des plaies, infections, thromboses veineuses profondes) dans le but de réduire l'incidence des POA et ce, quel que soit leur étiologie [75,83].

b) La mobilisation articulaire

Le bénéfice de l'entretien des amplitudes articulaires chez les patients présentant des POA est assez controversé. Certains auteurs dénoncent la mobilisation, notamment lorsqu'elle est trop précoce et intensive, comme favorisant la formation de POA par la création de microtraumatismes et

d'hémorragies [67,85]. Toutefois, la majorité des études s'accordent à dire que la thérapie physique contribue à préserver les amplitudes articulaires et à entretenir une meilleure fonction [17,67]. Elle implique généralement la mobilisation articulaire active et passive, des mouvements contre résistance, associés à des étirements [67].

Cette confusion serait liée à la temporalité et à l'intensité de l'application des mobilisations articulaires. Pour étayer ces hypothèses, Izumi et Michelsson ont pratiqué, en 1983, une alternance d'immobilisation sous plâtre et de mobilisation articulaire intense sur une patte arrière de rat [86,87]. En 1992, Daud et al. ont comparé 2 populations de patients BM, selon qu'ils aient débuté la thérapie physique avant ou après 7 jours suivant leur accident neurologique [88]. Ces données de la littérature révèlent trois éléments majeurs : 1) c'est la mobilisation suivant la phase d'immobilisation qui paraît favoriser le développement ultérieur de POA, 2) plus la phase d'immobilisation initiale est longue et plus le risque de développer une POA est grand et 3) une mobilisation intensive (vs douce) paraît aggraver le développement de POA, surtout lorsqu'elle est démarrée tardivement, c'est-à-dire, lorsque les processus de développement de POA sont enclenchés.

c) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

L'utilisation des AINS est généralement acceptée en prévention primaire des POA survenant dans les suites d'un traumatisme orthopédique [81-83,90]. Le principe d'action repose sur l'inhibition des prostaglandines, cytokines pro-inflammatoires connues pour contribuer à la formation osseuse et donc des POA [40].

L'utilisation d'indométacine, un inhibiteur non sélectif de la cyclo-oxygénase (COX-1), suivant l'implantation de PTH a été largement étudiée [81,88,94]. Le traitement par indométacine a été administré à différentes doses selon les études, 75 mg 2 fois par jour ou 25 mg 3 fois par jour, avec des résultats similaires sur la prévention des POA [13,81]. De même, différentes durées de traitement ont été comparées, entre 1 et 6 semaines en post-opératoire. L'administration d'un traitement bien conduit pendant 7 jours paraît être aussi efficace qu'une administration prolongée d'AINS [94] et permet par la même occasion de limiter l'inobservance et les effets indésirables (saignements digestifs, retard de cicatrisation cutanée, pseudarthrose). D'autres AINS non sélectifs tel que l'ibuprofène et le diclofénac ont également été décrits comme efficaces dans la prévention de POA après implantation de PTH [95]. Les inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) sont à considérer car réduisent le risque d'effets indésirables liés aux inhibiteurs non-sélectifs de COX (indométacine, ibuprofène, diclofenac...). Zhu et collaborateurs ont répertoriés 8 études démontrant que l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de la COX2 était aussi efficace sur la prévention de POA que l'utilisation d'inhibiteurs non-sélectifs des COX, tout en limitant les saignements digestifs et la mauvaise observance liés aux complications des inhibiteurs des COXs [96].

Contrairement aux PTH, l'administration d'AINS dans le cadre des fractures de l'extrémité supérieure du fémur et acétabulaires ostéosynthésées, n'a pas fait la preuve de son efficacité en terme de

réduction de survenue des POA. Trois essais cliniques, contrôlés, menés par 3 équipes différentes ont retrouvé des conclusions similaires [97–99]. De plus, dans leur étude, Sagi et coll. ont rapporté un taux élevé de pseudarthrose dans le groupe traité par indométacine 6 semaines, lorsqu'il était comparé au groupe placebo (62% versus 19%, respectivement) [99]. Des résultats similaires étaient retrouvés par Burd et coll. qui constataient une grande proportion de pseudarthrose après fracture des os long, chez les sujets présentant une fracture acétabulaire et traités par AINS [100].

Concernant la prévention des POA après arthroscopie, l'administration d'AINS semble réduire la prévalence radiologique des POA. La prévention médicamenteuse est préférentiellement prescrite en présence de facteurs de risque [82].

L'indométacine semble également être efficace en prévention primaire après des lésions médullaires [89–91].

Banovac et coll. ont mené un essai clinique contrôlé, randomisée, en double aveugle, chez des patients avec des lésions médullaires récentes [89]. Le groupe 1 recevait de l'indométacine 75 mg / jour alors que le groupe 2 a reçu un placebo. Les deux groupes ont été traités pendant 3 semaines. Une POAN a été mise en évidence chez 25 % des patients du groupe AINS et pour 65% des patients du groupe placebo. Par ailleurs, la formation osseuse était significativement plus tardive dans le groupe AINS (12,5%) par comparaison au groupe placebo (41%). L'apparition de signes inflammatoires (gonflement, rougeur et fièvre) étaient retardés dans le groupe AINS (31,7 +/- 7 jours contre 19,2 +/- 11 jours dans le groupe placebo) [92]. Dans une autre étude, les mêmes auteurs montraient qu'un inhibiteur sélectif de la COX2, le Rofecoxib 25mg/jour administré pendant 4 semaines, permettait de réduire de moitié le risque de développer une POAN, comparativement au groupe placebo [93]. Dans une étude très récente, Zakrasek et coll. soulignaient l'importance de poursuivre le traitement par AINS plus de 15 jours sous peine de réduire l'effet prophylactique des AINS chez les BM [90].

Bien que certaines institutions recommandent la prescription d'AINS 4 semaines (indométacine 75 mg LP/jour ou 25 mg 3/jour, ou celecoxib 200 mg/jour) dans le cadre de la prévention de POAN dans les suites d'une lésion médullaire, il n'existe pas de consensus clair à l'heure actuelle [90].

Le bénéfice des AINS est plus discutable dans la prévention primaire des POA après traumatisme crânien, brûlures et amputations. D'une part, ils ont été peu étudiés, rendant difficile de garantir un bénéfice de leur utilisation dans cette indication. D'autre part, les AINS sont d'une manière générale peu utilisés à cause des contre-indications chez ces patients combinant des risques d'infections cutanées, de pseudarthroses de foyers de fractures (études précliniques) et de saignements, du fait de leur pathologie initiale [6,8,91].

d) La radiothérapie

La radiothérapie est proposée dans le but de stopper la prolifération et la différenciation cellulaire des

cellules ostéoprogénitrices [94]. C'est pourquoi elle doit logiquement être administrée le plus tôt possible.

Dans les fractures acétabulaires, la radiothérapie à dose unique de 700 à 800 cGy, dans les 72 heures après chirurgie, a démontré une efficacité similaire à l'indométacine en terme de prévention des POA dans plusieurs essais cliniques [89,100]. Blokhuis et Frölke ont publié en 2009 une revue de la littérature répertoriant 5 études qui comparaient la radiothérapie à l'indométacine en prévention des POA après ostéosynthèse de fractures acétabulaires. Ils retrouvaient un bénéfice significatif de la radiothérapie par rapport à l'indométacine en se basant sur l'incidence des POA gênantes cliniquement (3% pour la radiothérapie contre 9% pour l'indométacine avec $p=0.034$) [101]. Bien qu'il n'y ait pas eu d'étude comparative, Piatek et coll. ont suggéré un bénéfice plus important d'une bithérapie par indométacine et radiothérapie par comparaison à des cohortes historiques qui utilisaient une monothérapie par indométacine ou radiothérapie en traitement préventif de POA après fracture acétabulaire [102]. Par manque de preuve en terme d'efficacité sur la prévention de POA après fracture acétabulaire, un traitement par bithérapie ne peut être recommandé à l'heure actuelle. Concernant la radiothérapie dans la prévention de POA après implantation de PTH, les études sont nombreuses et les recommandations assez claires [103]. Actuellement, la dose la plus largement prescrite est de 700 cGy en administration unique qui fait aussi bien que les administrations itératives et à des doses supérieures [104]. Le facteur le plus important dans la prophylaxie est le délai de la séance de radiothérapie par rapport à la chirurgie [103]. Dans leur étude, Seegenschmiedt et coll. concluaient que la radiothérapie doit avoir lieu dans les 8 heures avant la chirurgie ou dans les 72 heures suivant l'intervention pour être efficace [105].

La radiothérapie a été peu étudiée en prévention primaire dans les autres pathologies, elle ne constitue donc pas un traitement établi pour la prévention des autres causes de POA [6,91]. Elle est plus souvent administrée en prévention secondaire, sans toutefois avoir fait la preuve de son efficacité. Sautter-Bihl a traité 70 articulations dont 58 en prévention primaire (groupe 1), dès les premiers signes cliniques évoquant la survenue de POAN, et 12 après chirurgie afin d'éviter une récurrence (groupe 2). La dose administrée était de 10 Gy en une fois. Dans le groupe 1, aucune progression n'a été constatée pour 71% des articulations irradiées, sur une période de suivi de 11 mois [95]. Dans le groupe 2, aucune récurrence n'a été constatée chez 73% des patients. Cette étude montrait à la fois qu'une radiothérapie administrée rapidement après la lésion neurologique prévenait l'apparition de POANs mais aussi des récurrences lorsqu'elle était pratiquée après la chirurgie. Cipriano et coll., dans une étude cas-témoins, se sont intéressés aux effets d'une prophylaxie par radiothérapie chez des patients présentant des POAN suite à une lésion neurologique [96]. Comme pour les POA des traumatismes orthopédiques, la dose standard de radiothérapie était de 700 cGy. Les auteurs n'ont pas noté de diminution du taux de récurrence, au contraire, le taux de récurrence de POAN était supérieur dans le groupe traité (15%), que dans le groupe contrôle (5.1%), nécessitant une révision du protocole de l'étude. La conclusion de cette étude cas-témoins était en défaveur de la radiothérapie pour la

prévention des récurrences de POAN après leur résection chirurgicale chez les patients à haut risque. Un travail récent de Honoré et coll., confirme que la radiothérapie n'est pas un bon traitement de prévention secondaire, de plus, il augmente d'un facteur 5 le taux d'infection post-opératoire chez les patients BM (non publié).

En terme de sécurité, il n'a pas été décrit de pseudarthrose suite à l'utilisation de radiothérapie [81]. Sheybani et al. n'ont montré aucune élévation du risque cancéreux dans une cohorte de 3500 patients ayant bénéficié d'un traitement préventif par radiothérapie après implantation de PTH [106]. Toutefois, il a été décrit des effets aigus de radio-toxicité, majoritairement dans la période postopératoire. Ces effets sont non spécifiques de la radiothérapie et peuvent induire ou majorer un défaut de cicatrisation, aggraver l'inflammation locale, un hématome et favoriser une infection postopératoire. D'autre part, il existe des effets indésirables à moyen et long terme et notamment les effets sur la fertilité [97,98]. Patel et coll. recommandent l'utilisation de protège testicules chez les hommes de façon à limiter les effets néfastes sur la spermatogénèse [98].

Certains auteurs ont souligné le coût élevé de la radiothérapie en comparaison aux AINS et les difficultés d'accès notamment dans un contexte post-opératoire, imposant une surveillance clinique renforcée, la présence de redons et les pansements qui compliquent le transport [81].

e) Les biphosphonates

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet d'un traitement par biphosphonates sur l'évolution de POA de découverte récente. Les biphosphonates de première génération, comme l'etidronate disodium, ont une action anti-résorption osseuse induisant l'apoptose des ostéoclastes par l'inhibition de la formation de cristaux d'hydroxyapatites. Ils pourraient donc logiquement stopper la progression des POA [99]. Certaines études ont démontré que les biphosphonates sont efficaces sur la prophylaxie des POA se développant après lésion médullaire ou traumatisme crânien [91]. Dans une revue de la littérature datant de 2011, Teasell et coll. ont répertorié 6 études concernant l'utilisation de biphosphonates chez des patients BM [100]. Ils concluaient que l'etidronate administré à la dose de 10mg/kg/jour pendant 6 mois, était efficace sur la prévention des POA. En revanche, l'etidronate n'avait aucune efficacité lorsque le traitement était débuté tardivement alors que les POA étaient déjà visibles sur les radiographies [100]. Une autre revue plus ancienne s'est intéressée à l'effet de l'etidronate aux mêmes doses dans une population de TC. Le groupe traité a présenté des POA dans 20% des cas, contre 70% dans le groupe contrôle, concluant à une bonne efficacité de ce traitement dans la prévention primaire des POA chez les patients TC [101]. Finerman et coll, retrouvaient des résultats similaires chez des patients ayant bénéficiés d'une implantation de PTH avec seulement 19% de POA symptomatiques dans le groupe traité par etidronate [102]. Cependant, il existe quelques contre-indications (fractures...) ne permettant pas toujours la prescription précoce de ce traitement dans les populations de patients à risque de développer des POA [67]. Certains auteurs suggèrent que l'etidronate a un « effet suspensif ». Il agirait en retardant la minéralisation des POA plutôt que de

l'empêcher de façon définitive [103–105]. Ce traitement semble être efficace dans la mesure où il est maintenu. La minéralisation reprend à l'arrêt du traitement dans de nombreux cas, annulant ainsi l'avantage. Dans une population de grand brûlés, Shafer et coll. ont non seulement montré une inefficacité de l'étdronate en prévention primaire de la survenue de POA, mais en plus, il retrouvaient une augmentation du taux de patients avec POA dans le groupe traité (46.4%) contre 13.8% dans le groupe non traité [99].

f) Les autres thérapeutiques

En plus des traitements médicamenteux précédents, la recherche a été menée sur les effets de la Méthylprednisolone, la Warfarine, la Calcitonine et du Vérapamil dans le développement de POA [67,100]. A l'heure actuelle, aucune de ces thérapeutiques n'a fait la preuve de son efficacité chez l'être humain.

Au total, la littérature s'accorde à dire que la prescription d'AINS en l'absence de contre-indications et de fractures des os longs, doit se faire en première intention en prévention de POA suite à une fracture acétabulaire ostéosynthésée, implantation de PTH et lésion médullaire traumatique. Un choix préférentiel devrait se porter sur les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 afin de limiter les effets indésirables liés au traitement [81,90]. En seconde intention, il faudrait préférer l'administration d'une dose unique de radiothérapie 700-800 cGy dans les 72 heures suivant la chirurgie ou l'apparition des premiers symptômes en assurant une protection des parties génitales [81,90,103]. Une combinaison de différents traitements (AINS et mobilisation articulaire) s'est parfois révélée efficace [91,94].

3.1.6 Exérèse chirurgicale, seul traitement curatif

Comme nous venons de le voir, certains traitements préventifs ont également été testés comme potentiels traitements curatifs. Toutefois, leur effet reste limité et le seul traitement efficace une fois la POA installée reste la chirurgie d'exérèse [17,73].

La prise en charge chirurgicale concerne les POA gênantes, symptomatiques ou compliquées.

- L'exérèse de POAN sera urgente en cas de compression vasculaire. Des complications thromboemboliques peuvent survenir s'il existe une compression veineuse [69]. Plus rarement, des signes d'ischémie chronique évoqueront une souffrance artérielle.
- La prise en charge devra également être rapide devant des signes de souffrance neurologique périphérique. Cette complication est fréquemment rencontrée au coude, lorsque la POA se développe dans sa partie postéro-interne induisant une souffrance du nerf ulnaire notamment chez le traumatisé crânien ou le grand brûlé [6,17,69]. Une compression du nerf ischiatique doit également être recherchée devant une POA postérieure de hanche. Dans une étude précédente, nous avons montré que 47% des patients ayant été opérés pour POAN postérieures de hanche avaient également bénéficié

d'une neurolyse du nerf ischiatique (Figure 8) [63]. Parmi ces patients, seulement 22% présentaient une symptomatologie clinique. On peut expliquer ce phénomène par la présence de troubles de la sensibilité ou l'impossibilité de certains patients à exprimer la douleur (aphasie, troubles cognitifs). Les électromyogrammes, lorsque réalisés, ne montraient des anomalies que dans la moitié des cas et ne permettaient donc pas de déceler certains patients avec souffrance du nerf ischiatique. En revanche, 100% des angioscanners réalisés mettaient en évidence un rapport très étroit, voire un enclassement du nerf ischiatique au sein de la POA. Nous avons finalement conclu que cette complication était largement sous-diagnostiquée et qu'un angioscanner montrant un rapport très étroit entre nerf et POA associé à un examen clinique contributif étaient suffisants à poser une indication opératoire. L'EMG ne nous paraissait pas nécessaire devant la difficulté d'accès, de réalisation et le grand nombre de faux négatifs dans notre étude.

- Une limitation progressive des amplitudes articulaires retentissant sur l'installation au lit ou au fauteuil, sur les transferts, les déplacements, l'utilisation d'aides techniques mais aussi ayant un retentissement sur l'hygiène (accès au périnée, macération) devra faire envisager une chirurgie [67].

- La présence de douleurs non contrôlées par un traitement médicamenteux optimal et bien mené conduira à l'ablation de la POA. Elle est souvent difficile à prendre en charge à la phase aiguë chez des patients fragiles ayant de nombreux facteurs de comorbidités et susceptibles aux effets secondaires (AINS, morphiniques...). Il a été montré que ces douleurs sont parfois sources de grand inconfort notamment chez des patients présentant des troubles de la communication. Elles sont alors un frein à la récupération physique et surtout des fonctions supérieures. Il a été montré par Denys et coll. qu'un soulagement de ces douleurs permet une amélioration des performances cognitives [106].

- Il peut exister un risque cutané tel que l'apparition d'escarres en regard de zones d'hyper appuis causées par une position vicieuse ou encore une macération des plis motivant un geste chirurgical [91,100].

Ces éléments, dont la réduction des amplitudes articulaires au premier plan, concourent à une restriction d'autonomie dans les activités de la vie quotidienne (habillage, toilette, alimentation...) et entravent la rééducation. Ils ont également un retentissement psychologique important car ils conduisent à une restriction des activités et un accroissement de la dépendance [107].

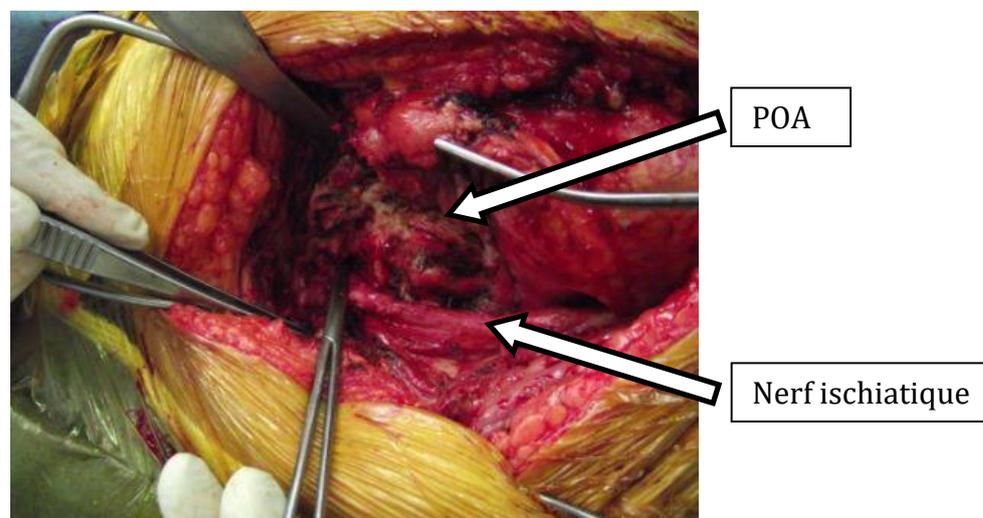


Figure 8. Chirurgie de neurolyse du nerf ischiatique lors d'une ablation d'une POAN postérieure de hanche.

Les objectifs de la chirurgie sont discutés pendant une consultation médico-chirurgicale réunissant des chirurgiens orthopédistes, des médecins de Médecine Physique et de Réadaptation, le patient et sa famille ou ses aidants [108]. Les thérapeutes doivent tenir compte de la gêne du patient, de son état neurologique et psychologique, de ses capacités fonctionnelles réelles et du bénéfice que peut apporter la chirurgie [20]. On devra évidemment tenir compte des comorbidités de la technique chirurgicale et des possibilités de prise en charge post-opératoire.

Dans certains cas, l'exérèse ne sera que partielle (fragilité de la tête fémorale, risque de lésion vasculaire...) ou bien, l'abstention thérapeutique sera retenue (objectifs de la chirurgie peu clairs, contre-indication à la chirurgie, risque d'aggraver la dépendance).

Un angioscanner avec reconstruction en trois-dimensions sera réalisé avant toute chirurgie dans le but de déterminer les rapports anatomiques de la POAN avec les structures avoisinantes, l'état osseux et articulaire. Un geste associé à l'ablation de la POAN sera parfois nécessaire (neurolyse, libération vasculaire, pose d'une prothèse totale de hanche, ténotomie) [20,108].

Une étude récente préconise la prise en charge précoce des POAN, dès que les facteurs de comorbidités sont maîtrisés et que la POAN est assez constituée pour permettre au chirurgien de trouver un plan de clivage [72].

La prise en charge chirurgicale tardive peut conduire au développement d'une perte osseuse majeure des têtes fémorales entraînant un risque de fracture per ou post-opératoire lors de la reprise de la rééducation [72]. Des lésions intra-articulaires vont apparaître progressivement et évoluer vers la destruction articulaire. La réduction progressive des amplitudes articulaires peut évoluer jusqu'à l'ankylose complète à l'origine de difficultés d'installation au fauteuil ou au lit et de l'apparition d'escarres [72].

Une prise en charge précoce permettra en plus de prévenir les complications précédentes, de faciliter le geste chirurgical (voie d'abord, installation du patient sur la table opératoire), prévenir les rétractions musculo-tendineuses et capsulo-ligamentaires à l'origine de positions vicieuses souvent difficiles à prendre en charge, l'amyotrophie et la reprise précoce du programme rééducatif [20].

Les résultats de la littérature chirurgicale s'accordent à dire que le gain d'amplitude articulaire en post-opératoire est amélioré ainsi que les résultats fonctionnels [109,110].

Les deux principales complications dans les suites de la chirurgie sont l'infection du site opératoire et la récurrence de la POA.

Les infections sont plus fréquentes chez les patients opérés de POA que pour les autres chirurgies de hanche. Dans une série publiée par Gatin et coll, 10% des patients opérés pour POAN de hanches ont présenté une infection post-opératoire. Les infections étaient plus fréquentes chez les patients BM (22%) que pour les patients cérébrlésés (5%). Ce taux est anormalement élevé lorsqu'on le compare aux chiffres habituellement constatés en chirurgie programmée de la hanche (environ 1 à 1,5% d'infection sur implantation d'une prothèse totale de hanche) [111,112]. De façon surprenante, les germes retrouvés chez les patients cérébrlésés provenaient le plus souvent de la sphère uro-digestive alors que les bactéries identifiées chez les patients BM sont des germes de la flore cutanée [112]. Plusieurs hypothèses ont été élaborées. Pour les germes provenant du tube digestif et voies urinaires : existence d'une fistule digestive ou urinaire communiquant avec l'articulation, translocation bactérienne lors d'un stress, infection digestive ou urinaire péri-opératoire. Ces phénomènes peuvent exister malgré les antibioprophylaxies peri-opératoires mais semblent rares. Concernant, les germes cutanés chez les patients BM, une hypothèse assez séduisante serait la modification du pH cutané après lésion médullaire. Suite à ce travail, Verdaguer et coll. ont effectivement montré que les patients BM présentaient un pH plus basique et étaient, peut-être de ce fait, plus sujets à la prolifération d'une flore cutanée agressive que les sujets sains (non publié).

Le taux de récurrence est difficile à interpréter car il dépend de la définition utilisée : radiologique ou clinique. Les récurrences radiologiques de POAN, sans symptômes cliniques, concernent entre 82 et 100% des patients opérés alors que les récurrences cliniques peuvent atteindre 58% des POAN opérées mais ces chiffres sont issus d'études anciennes [40,113]. Chez une population d'amputés traumatiques, Potter et coll. n'ont noté aucune récurrence symptomatique [114], alors que Pavey et coll. comptaient 6,5% de patients ayant nécessité une ré-intervention pour récurrence de POA. Ils soulignaient que les récurrences symptomatiques étaient le plus souvent associées à une exérèse initiale partielle et lorsque la première chirurgie était réalisée dans les 180 jours suivant le traumatisme initial. En revanche, ils ne montraient aucune corrélation entre récurrences et la présence d'une lésion associée du SNC, l'expérience du chirurgien ou encore la prophylaxie post-opératoire [115]. Dans une série de 606 chirurgies pour POAN réalisées sur l'hôpital Raymond Poincaré de Garches, Grelier et coll. retrouvaient un taux de récurrences de 2,8%, intéressant

principalement les patients traumatisés crâniens et les POA localisées autour de la hanche (non publié). Pendant longtemps, on a considéré qu'une première chirurgie d'exérèse sur un os insuffisamment mature, encourageait la récurrence post-opératoire [116]. On sait maintenant que cette affirmation est erronée. En effet, Genêt et coll. ont montré qu'opérer des POAN précocement, dans la première année suivant l'accident neurologique, ne favorisait pas la récurrence des POA [57,117]. Ils ont été plus loin en affirmant que la taille de la POA préopératoire, la gravité du déficit cognitif et moteur des patients opérés et le caractère multi-site de la POA à réséquer, ne sont pas corrélés à la récurrence des POA [57,117-119]. La prévention des récurrences n'est absolument pas consensuelle. Elle repose sur une reprise douce de la rééducation après une dizaine de jour d'immobilisation, non stricte, de l'articulation et la prise orale d'AINS pour la même durée de temps. L'idée en post-opératoire est de ne pas encourager l'inflammation des tissus et les saignements par la mobilisation trop précoce de l'articulation. L'administration d'AINS, comme en prophylaxie primaire réduirait l'inflammation locale mais aussi systémique lié à la chirurgie.

3.2 Leurs divergences : prévalence et facteurs de risques

Le retentissement clinique lié à la formation d'ossifications hétérotopiques, est aléatoire selon la localisation, le volume, l'étiologie des POA et la présence de comorbidités chez un même individu. Certaines ossifications sont asymptomatiques et peuvent n'être jamais diagnostiquées ou bien découvertes de façon fortuite sur une imagerie. D'autres peuvent entraîner des symptômes voire des complications, source de sur-handicap [5].

3.2.1 Traumatisme orthopédique

Les POA peuvent apparaître autour des articulations dans un contexte traumatique local tel qu'une fracture acétabulaire ou de l'extrémité supérieure du fémur ostéosynthésée, fracture-dislocation du coude opérée, arthroscopie de hanche et implantation d'une prothèse totale de hanche (PTH) [17,94,120]. La prévalence des POA s'élève à 8,6% pour les fractures-dislocations des coudes opérés, de 1% à 12% pour les arthroscopies de hanche, environ 40% dans les suites d'une fracture acétabulaire ou de l'extrémité supérieure du fémur et jusqu'à 90% après l'implantation d'une PTH [17,94,120,121]. La prévalence clinique des POA, diagnostiquées sur une symptomatologie gênante, est à dissocier de la prévalence radiologique, souvent bien plus importante. En 1973, Brooker et coll. ont observé un nombre très élevé d'ossifications ectopiques sur des clichés radiologiques de routine réalisés lors de contrôle radio-cliniques des patients implantés d'une PTH [122]. Ils ont également constaté que très peu de patients étaient gênés par le développement de telles ossifications. Ils ont alors imaginé une classification radiologique des POA en 4 stades qui a depuis été revisitée par d'autres équipes mais dont la version originale reste la référence dans les publications (Figure 9) [122-124].

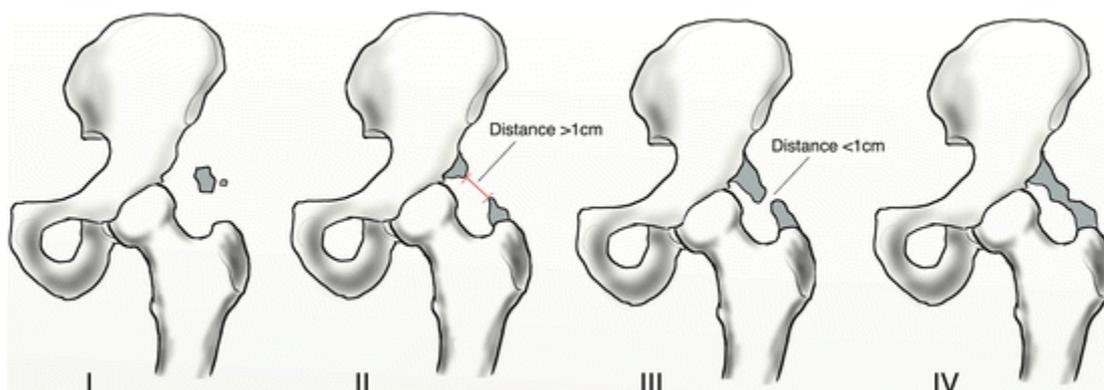


Figure 9. Classification de Brooker [122].

Stade I, îlot osseux dans les parties molles ; Stade II, Eperons osseux s'insérant sur le bassin et la partie supérieure du fémur, séparés d'une distance $>$ à 1 centimètre ; Stade III, Eperons osseux s'insérant sur le bassin et la partie supérieure du fémur, séparés d'une distance $<$ à 1 centimètre ; Stade IV, Fusion des éperons osseux et ankylose articulaire. Image provenant de l'ouvrage de Kanakaris et collaborateurs [125].

Les volumineux POA, correspondant aux stades III et IV de la classification radiologique de Brooker, sont généralement symptomatiques et dans ce cas, leur prévalence est plus faible : 19 à 38% après PTH et 2,7% suite à une ostéosynthèse pour fracture acétabulaire [110,121,126].

Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés dans la formation de POA après traumatisme orthopédique : sexe masculin, antécédent de chirurgie au même site, long délais entre fracture et geste d'ostéosynthèse, nécroses musculaires locales non débridées [94,120,127,128].

La survenue de POA après implantation de PTH, serait favorisée par un temps prolongé de pose de garrot, l'utilisation d'implants cimentés et certaines voies d'abord chirurgicale [17]. De même, la voie d'abord utilisée pour les ostéosyntheses des fractures acétabulaires ou de l'extrémité supérieure du fémur, a un impact majeur dans la survenue de POA post-opératoire. Dans une revue de la littérature, Guo et coll. rapportent un taux de POA de 33.3% après utilisation de la voie d'abord latérale avec trochantérotomie, 36.9% par voie postérieure et 42.1% par voie antérieure [129]. L'hypothèse serait que les voies latérale et postérieure permettraient de limiter les risques d'atteinte vasculaire et d'ostéonécrose de la tête fémorale, contrairement à la voie antérieure.

Les POA se développant après fracture-dislocation du coude apparaissent volontiers lors de l'utilisation de greffe osseuse ou substitut, de fracture associée de l'extrémité inférieure de l'humérus et de fracture complexe du coude (« terrible triad fracture », Monteggia fracture-dislocation) [17]. D'autres facteurs de risque sont en lien avec la gravité du traumatisme initial lorsque les fractures surviennent dans le cadre d'un polytraumatisme, comme l'admission en réanimation, la durée d'hospitalisation, la durée de ventilation mécanique, l'association à d'autres fractures, à un traumatisme crânien et/ou thoraco-abdomino-pelvien [127,128,130].

Lorsqu'il s'agit de POA survenant après arthroscopie de hanche, les facteurs de risque identifiés sont la résection combinée d'ostéophytes à la fois sur l'acétabulum et le col fémoral et les capsulotomies non suturées [120].

3.2.2 Brûlures étendues

Les POA dans un contexte de brûlures aiguës ont été pour la première fois décrites en 1957 par Johnson [131]. L'incidence oscille entre 0,15% et 4,7% selon les études. Il semble que le taux de POA après brûlure soit en constante augmentation depuis ces dernières années, probablement expliqué par une amélioration de la survie chez les brûlés graves [16,132]. Il a été constaté que les études au design prospectif rapportent une incidence plus importante que les études rétrospectives [53,133].

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés dans le développement de POA après brûlures. Une revue exhaustive de la littérature réalisée par Kornhaber et coll., retrouve de façon constante la sévérité des lésions comme étant le facteur le plus fortement corrélé à l'apparition de POA [6,133]. Le caractère de sévérité des lésions est défini par le taux de surface corporelle brûlée, brûlure de 2^{ème} et 3^{ème} degré, passage en réanimation et/ou ventilation mécanique et brûlure associée des voies respiratoires [6]. Schneider et coll. ont imaginé un score de risque pour stratifier les patients dès leur arrivée à l'hôpital selon leur risque de développer des POA [132]. Le score de risque augmente de 13% par % de surface corporelle brûlée. Lors de l'établissement de ce score de risque, les auteurs ont identifiés la greffe de peau pour brûlure des bras, de la région tête et cou et du tronc comme ayant respectivement 5,0, 2,7 et 2,4 fois plus de risque de développer des POA que les patients non greffés ou greffés sur d'autres sites [132]. Les études les plus récentes ont rapporté un important risque de POA associé à une augmentation du temps de cicatrisation des plaies (8% d'augmentation de risque par jour), du délai de la greffe cutanée par rapport à la date de l'accident et du nombre de chirurgies pour greffe par patients [56,133]. Les sepsis et infections cutanées ont également été identifiés par Medina et Hunt comme étant corrélés à la survenue de POA après brûlures [16,53]. Thefenne et coll. ont caractérisé deux autres facteurs de risque qui sont l'utilisation de curares et de matelas fluidisés [134]. D'autres variables ont été identifiées comme favorisant le développement des POA tels qu'un long délai avant le début de la kinésithérapie et de la mobilisation des amplitudes articulaires, la durée d'immobilisation et l'apparition de contractures [6,21]. Il faut souligner que ces variables sont dépendantes des facteurs précédemment cités. En effet, un patient gravement brûlé, ayant bénéficié d'une greffe cutanée compliquée d'une infection, présentera probablement un retard de cicatrisation. Il sera plus longuement immobilisé, ce qui favorisera l'apparition de contractures et retardera la mobilisation articulaire augmentant alors le risque de développer une POA. Cette observation souligne la difficulté d'identifier, dans ces études rétrospectives, des facteurs de risque cliniques spécifiques de la survenue de POA, tout en écartant les facteurs confondants qui ne sont que le retentissement ou en lien étroit avec d'autres variables.

3.2.3 Amputations traumatiques

Comme pour les POA après brûlures, la prévalence des POA suite à des amputations traumatiques a

tendance à augmenter ces dernières années [135,136]. Les progrès en terme de matériel de protection et d'organisation des soins au front des grandes zones de combats ont permis d'améliorer la survie des soldats [136]. Daniels et coll. observaient une augmentation du nombre de POA suite à des amputations, tout comme le nombre d'amputation lui-même, le nombre de transfusion sanguine chez les soldats amputés, de jour de ventilation mécanique et d'hospitalisation en réanimation [135]. Dans une série de 213 membres amputés, Potter et coll. retrouvaient 134 (63%) POA radiologiques dont 25 (12%) ont nécessité une résection chirurgicale [114].

La survenue et la sévérité des POA ont été rattachées à plusieurs variables identifiées par des analyses statistiques univariées que sont : les traumatismes par explosion (blast) et les amputations faites au niveau de la zone touchée et un traumatisme crânien associé [7,114,136,137]. L'analyse multivariée a permis de trouver d'autres facteurs indépendamment associés à l'apparition de POA après amputation : un Injury severity score >16, l'âge < 30 ans, des blessures multiples des membres, de nombreux débridements cutanés avant cicatrisation et la présence d'une amputation [7,114,138]. Jusqu'à récemment et de façon surprenante, ce dernier paramètre n'était pas associé avec la survenue de POA [136]. Même si les infections de moignon ne semblent pas corrélées à l'apparition de POA, une étude récente de Pavey et coll. retrouve que l'application d'antibiotiques en poudre, sur le membre fraîchement amputé diminue la taille des POA, sans pour autant pouvoir prévenir leur apparition [139].

Au terme de ce paragraphe, on peut observer que toutes les études traitant de l'apparition de POA après amputation traumatique concernent des accidents militaires et non civils. Il est probable que les caractéristiques de l'accident initial et le contexte de prise en charge jouent un rôle important dans le déclenchement du processus d'ostéogénèse conduisant aux POA. Ainsi, une amputation pour traumatisme de guerre apparaît beaucoup plus délabrante que les accidents civils, essentiellement en lien avec la cause et le contexte du traumatisme (engins explosifs, ondes du choc).

3.2.4 Atteinte du système nerveux central

Les POAN ont été largement décrites dans la littérature. Elles sont plus fréquentes chez les patients blessés médullaires (20-29%) et traumatisés crâniens (5-20%) [57,58,61,140,141]. On peut également les rencontrer suite à un accident vasculaire cérébral (5%) ou encore une anoxie cérébrale (1%) [57]. Certains cas de POAN ont été rapportés après une encéphalite [142].

Comme nous l'avons évoqué pour les POA secondaires à un traumatisme orthopédique, la grande variation des chiffres de prévalence peut être attribuée aux critères diagnostiques cliniques vs radiologiques mais aussi à la taille de la population, la méthodologie de l'étude (prospectif versus rétrospectif) et enfin la durée du suivi des patients [121]. Les chiffres sont donc très hétérogènes mais nous avons fait le choix, ici, de retenir les taux de POAN cliniquement ou fonctionnellement gênantes.

Si la définition de POAN semble claire, la sévérité de l'atteinte neurologique centrale requise pour faire

la différence entre POA et POAN n'a pas été définie et n'est pas toujours bien détaillée selon les études [65]. Toutefois, le TC comme la BM ont été identifiés comme étant des facteurs de risque indépendants de survenue de POAN [65].

Concernant les patients lésés médullaires, on retient comme facteurs prédisposants au développement de POAN, des caractéristiques en rapport avec l'état neurologique : le caractère complet de la lésion médullaire, l'origine traumatique et le niveau lésionnel haut situé (>D6) [61,143-145]. Le retard de mobilisation passive (< 7 jours post-traumatiques) [58,86,88] et l'admission tardive en centre spécialisé [146,147] ont été également corrélés à l'apparition de POAN chez les patients BM. Quelques études retrouvent un lien entre des situations inflammatoires (thromboses veineuses profondes, escarres) et la présence de POAN [61,70,143,144,148] et d'autres ont mis en évidence la corrélation entre infections (urinaires, pulmonaires) et développement de POAN [61,145]. La nécessité d'avoir recours à une trachéotomie a également été retrouvée comme facteur corrélé à l'apparition de POAN chez les patients BM [145].

Suero et coll. ont récemment développé un score prédictif de survenue de POAN à la hanche chez les patients BM dans les 3 mois suivant leur accident [149]. Ce score sur 35 prend en compte le caractère complet de la lésion médullaire, l'âge et le sexe du patient, le développement d'une infection urinaire ou pulmonaire et la présence d'une hypertonie spastique. Le risque de développer une POAN augmente avec le score. Ainsi, le risque est de 1 chez les patients avec un score entre 0 et 17 puis augmente de 2.47 fois pour les sujets avec un score entre 1 to 21, de 4.75 fois pour les personnes avec un score entre 22 et 27, de 6.95 fois pour les patients avec un score entre 28 et 31 et enfin, de 9.23 fois chez les patients avec un score entre 32 et 35. L'établissement de ce score de risque est intéressant car il permet de détecter précocement les patients à risque et de les suivre de façon rapprochée pour proposer une prise en charge adaptée si nécessaire.

De nombreux critères cliniques sont corrélés à la formation de POAN chez les patients TC. Comme pour les BM, certains sont en lien avec la gravité du traumatisme neurologique : l'importance du traumatisme crânien [141,150], la durée de coma prolongée [141,150], la présence d'une parésie [59] et de phénomènes dysautonomiques [141,150]. D'autres sont en rapport avec des atteintes associées, survenant au même moment que le TC, tels que le contexte de polytraumatisme avec un Injury Severity Score (ISS) élevé [58], la présence de fractures et le traitement chirurgical des foyers de fracture [141,150,151]; ou bien, survenant peu de temps après le TC comme les infections pulmonaires [140,152]. Certains auteurs ont identifié des critères en rapport avec des soins d'urgence vitale tels que l'admission en réanimation, la durée de ventilation mécanique et d'hospitalisation, la nécessité d'avoir recours à une trachéotomie, comme étant des facteurs de risque de survenue de POAN [113,141,150,151]. Enfin, il existe des caractéristiques attribuées au patient lui-même : l'âge supérieur à 11 ans [153] et la participation génétique qui est d'avantage contestée selon les études (HLA B 18, D.R. 7, HLA B27) [96,154].

Bien que les POAN suite à un TC dans la population civile soient fréquents, il est apparu dans la littérature de ces 20 dernières années de plus en plus de cas de POAN décrits après TC sur blast chez les militaires revenant blessés des zones de guerre [7,114]. Pendant les derniers conflits en Irak et Afghanistan, il a été estimé que 78% des blessures étaient liées à un engin explosif, c'est pourquoi les TC par blast ont été appelés la « blessure signature » de ces opérations militaires [155]. Le terme blast en anglais désigne une explosion et le souffle qu'elle provoque. Le blast génère des ondes supersoniques de pressions à haute énergie, un champ électromagnétique, de la chaleur et des gaz toxiques qui peuvent endommager le SNC et ainsi conduire au déclenchement des processus d'ostéogénèse conduisant aux POAN [8,156]. Bien que la prévalence des POAN ne soit pas exactement connue après un TC par blast du fait d'un nombre limité d'études, il semblerait que leur taux soit bien supérieur aux POAN survenant pour d'autres causes de TC, notamment chez les civils [50,114]. Forsberg et coll. se sont intéressés à la prévalence des POAN dans les suites d'un polytraumatisme causé par des combats militaires [7]. Dans la cohorte, les soldats avaient bénéficié d'au moins une chirurgie orthopédique des membres et présentaient un polytraumatisme provoqué par un blast. Des POA se sont développées chez 68% des patients sans TC et chez 86% des patients avec TC provoqué par un blast [7]. Cette étude soulignait, comme pour les amputations traumatiques, l'augmentation du taux de POA dans un contexte de blast mais a aussi permis de montrer que le TC par blast apparaissait comme un fort facteur prédictif de la survenue de POAN [7].

Le lien entre hypertonie spastique et POAN est plus débattu dans la littérature. Certains auteurs l'identifient comme facteurs de risque, d'autres le considèrent comme étant la conséquence du développement de la POAN. En effet, il est impossible d'exclure que l'augmentation de l'hypertonie spastique soit due au développement de la POAN, le mécanisme physiopathologique restant, à l'heure actuelle méconnue. La lésion musculaire provoquée par le développement de la POAN intramusculaire pourrait être à l'origine d'une augmentation de la spasticité en agissant comme une épine irritative [60,61,143,145]. Cette hypothèse fait l'objet du Chapitre 2.

Comme nous l'avons évoqué, le caractère poly-traumatique, même chez les civils, représente un sur-risque d'apparition de POAN chez les patients présentant une lésion du SNC concomitante [58,138]. Pape et coll. ont comparé deux groupes de patients polytraumatisés, avec ou sans TC. Ils retrouvaient une prévalence plus élevée (> 40%) que lors de lésions neurologiques centrales isolées, sans qu'il existe une différence significative de survenue de POA entre ces deux groupes (46,9% pour le groupe de polytraumatisés avec TC et 42,7% pour le groupe de polytraumatisés sans TC). Ces chiffres élevés semblent plus en rapport avec le contexte de polytraumatisme que lié à la présence d'un TC [157]. Bien que dans ce cas, on ne puisse pas parler de POAN, les patients victimes de polytraumatisme semblent cumuler plusieurs facteurs de risques sus-cités : fractures, chirurgies, infections, thromboses veineuses, escarres, ...) et nécessitent généralement des soins complexes et une prise en charge

prolongée en réanimation [50,65,158]. Ces patients peuvent également présenter différentes pathologies conduisant au développement de POA (brûlures, fractures, séjour en réanimation...) expliquant la forte prévalence des POA dans cette population de patients.

Il faut noter que la majorité de ces études sont rétrospectives et s'intéressent aux facteurs présents lors du diagnostic des POAN. Les escarres, infections, phénomènes dysautonomiques, déficit moteur des membres, hypertonie spastique, thromboses veineuses profondes ou encore escarres sont des éléments fréquemment associés chez les patients atteints d'une lésion du SNC. Comme pour les grands brûlés, certaines variables peuvent être considérées comme des facteurs confondants, c'est-à-dire qu'ils apparaissent très fréquemment dans ces populations de patients et seraient donc faussement corrélés à la survenue de POAN. De même, un long séjour en réanimation, une longue durée de ventilation mécanique et les infections pulmonaires sont généralement liés les uns des autres et on les retrouve comme facteur de risque de survenue de POA dans plusieurs situations (brûlures, amputations traumatiques, atteinte du SNC et POA secondaire à un séjour en réanimation). Il apparaît évident que la gravité de la lésion neurologique prédispose au développement de POAN, toutefois, elle n'est pas obligatoire. Par ailleurs, la gravité du contexte clinique et le cumul de facteurs de risques semblent nettement augmenter le risque de développer une telle complication.

3.2.5 Long séjour en réanimation

Des cas de POA ont été décrits après hospitalisation en réanimation pour d'autres étiologies que celles évoquées précédemment (brûlures étendues et TC). Des POA peuvent se développer après pancréatite aiguë, syndrome de Guillain Barré, syndrome de détresse respiratoire aiguë, ou encore syndrome de Lyell (nécrolyse épidermique toxique) [159–161]. La prévalence de ces POA est difficile à estimer car elles sont assez rares comparativement aux POA d'autres étiologies. Zeilig et coll. ont rapporté 6% de POA survenant après Syndrome de Guillain Barré [162]. Dans tous les cas, les patients avaient été hospitalisés en réanimation et présentaient un grade 9 à la Disability Grading Scale correspondant à une tétraplégie complète et la nécessité d'avoir recours à une assistance ventilatoire. Les auteurs n'ont constaté aucune différence entre les patients avec et sans POA et ayant bénéficié d'une ventilation mécanique en terme de récupération neurologique, suggérant alors que d'autres facteurs étaient nécessaires à la formation de POA [162]. Dans une autre série de cas, Goodman et coll. ont décrit 6 POA survenant chez des patients hospitalisés en réanimation pour des raisons différentes (1 cholécystectomie, 1 pleurésie purulente à *streptococcus pneumoniae*, 1 hystérectomie, 1 lobectomie, 1 transplantation pulmonaire, 1 pancréatite) [161]. Par la suite, l'ensemble des patients a développé un syndrome de détresse respiratoire aiguë et a nécessité une administration prolongée de curares. Comme Théfenne et coll. chez le patient avec brûlures étendues, cette étude incrimine le blocage prolongé de la jonction neuromusculaire par des curares comme pouvant être un facteur de risque de survenue des POA [134,161]. Si l'on regarde plus en détails, on s'aperçoit que ces patients ont

également tous contractés plusieurs infections dont des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM), et 5 d'entre eux ont également bénéficié d'une chirurgie très lourde [161].

Un cas de POA a été décrit dans la littérature après un syndrome de Lyell. Le patient avait, comme chez les grands brûlés, bénéficié de soins cutanés et d'une hydratation spécifique dans une unité dédiée [163]. Il avait au préalable contracté une infection d'un kyste sous cutané à *Staphylococcus aureus*, raison pour laquelle, il avait été traité par plusieurs lignées d'antibiotiques dont du Bactrim, à l'origine de la nécrolyse épidermique toxique. Il a par la suite, contracté plusieurs PAVM, nécessitant une ventilation mécanique de 4 semaines et présenté un déficit moteur des 4 membres régressif, faisant évoquer une polyradiculonévrite de réanimation [163].

Nous avons fait le choix de classer les POA se développant dans un contexte d'atteinte neurogène périphérique dans ce groupe plutôt que dans les POAN secondaires à une lésion du SNC car selon nous, l'atteinte du premier motoneurone est à dissocier de celle du second motoneurone dans la genèse des POA, comme nous allons le développer plus en détails. D'autre part, le contexte de survenue de POA est différent dans ces 2 entités. Les atteintes neurologiques périphériques à l'origine de POA ont un mécanisme initial inflammatoire ou médicamenteux, alors que les lésions centrales du SNC sont essentiellement traumatiques ou vasculaires.

3.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu observer qu'il existe des facteurs de risque spécifiques à chacune des pathologies susceptibles de développer des POA mais aussi des terrains communs qui apparaissent comme un passage obligé, ou un seuil à atteindre, pour conduire à l'apparition de POA. Nous avons fait le choix de présenter les différents facteurs de risque conduisant aux POA de façon séparée, selon les étiologies des POA. Toutefois, de façon constante tout au long de ce chapitre, nous avons pu noter que c'est l'accumulation et l'intrication des différentes atteintes infectieuses, inflammatoires (nombreuses chirurgies, fractures, pancréatite aigüe, nécrolyse épidermique, polyradiculonévrite, amputations, brûlures) et neurologiques (lésion du SNC, blocage de la jonction neuromusculaire par des curares) qui est à l'origine des POA. Les derniers cas de POA décrits au décours d'un long séjour en réanimation sont intéressants car ils résument bien l'intrication qu'il peut exister entre ces différents éléments, nécessaires à la formation de POA. C'est typiquement ce que l'on observe chez les patients militaires et polytraumatisés qui présentent logiquement un sur-risque de développer des POA [158]. Il en est de même chez les civils, les POA sont plus fréquentes lorsque les patients combinent neuro-trauma et fractures périphériques plutôt que des fractures isolées [164–166]. Toutefois, le caractère rétrospectif de ces études ne permet pas toujours de bien différencier facteurs de risque et facteurs confondants. Dans ce cas, la recherche fondamentale est utile pour tester indépendamment chaque facteur, c'est ce que nous avons fait pour l'hypertonie spastique grâce au modèle murin développant des POAN (voir chapitre 2). La mise en place de l'étude BENTHOS avec recueil de données cliniques prospectif (voir chapitre 5) permettra également de s'affranchir des limitations des études de design rétrospectif.

	Traumatismes orthopédiques	Pathologies neurologiques centrales	Grand brûlés	Amputés	Long séjour en réanimation
Facteurs de risque communs	<ul style="list-style-type: none"> • Polytraumatisme 				<ul style="list-style-type: none"> • Admission en réanimation • Longue durée de ventilation mécanique • Chirurgie • Présence de traumatisme associé (fractures, thoracique, abdominal, pelvien), Injury severity score élevé >16 • Long délai avant début de la kinésithérapie • Long délai avant mobilisation des amplitudes articulaires • Longue durée d'immobilisation • Infections (cutanées, pulmonaires, urinaires)
		<ul style="list-style-type: none"> • Admission en réanimation • Longue durée d'hospitalisation • Longue durée de ventilation mécanique • Chirurgie • Présence de traumatisme associé (fractures, thoracique, abdominal, pelvien), Injury severity score élevé >16 • Long délai avant début de la kinésithérapie • Long délai avant mobilisation des amplitudes articulaires • Longue durée d'immobilisation • Infections (cutanées, pulmonaires, urinaires) 			
Facteurs de risque spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> • Antécédent de chirurgie au même site • Long délais entre fracture et geste d'ostéosynthèse • Nécroses musculaires locales non débridées • Temps prolongé de pose de garrot • Utilisation d'implants cimentés • Voies d'abord chirurgicale antérieure • Présence d'un traumatisme crânien associé 	<ul style="list-style-type: none"> • Caractère complet de la lésion médullaire • Origine traumatique de la lésion médullaire • Niveau lésionnel haut situé (>D6) • Thromboses veineuses profondes • Escarres • Trachéotomie • Hypertonie spastique • Gravité du traumatisme crânien • Coma prolongée • Présence d'une parésie • Dysautonomie 	<ul style="list-style-type: none"> • Taux de surface corporelle brûlée • 2^{ème} ou 3^{ème} degré • Greffe de peau pour brûlure des bras, de la région tête et cou et du tronc • Augmentation du temps de cicatrisation des plaies • Délais de la greffe cutanée par rapport à la date de l'accident • Nombre de chirurgies pour greffe • l'utilisation de curares et de matelas fluidisés 	<ul style="list-style-type: none"> • Traumatismes par explosion (blast) • Amputations faites au niveau de la zone touchée • Traumatisme crânien associé • Nombreux débridements cutanés 	

Tableau 2 : Facteur de risques communs et spécifiques des POA selon la pathologie d'origine.



III. L'inflammation aigüe

Face à une agression, les tissus vascularisés de l'organisme répondent par une réaction inflammatoire. L'inflammation se manifeste par des réactions systémiques et locales. L'ensemble des manifestations systémiques sont regroupées dans le syndrome inflammatoire de réponse systémique (SIRS) qui comprend : température rectale $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; tachycardie >90 battements par minute ; polypnée >20 cycles par minute ou pression artérielle en CO_2 <32 mmHg ; leucocytes $>12000/\text{mm}^3$ ou $<4000/\text{mm}^3$ ou $>10\%$ de formes immatures [167]. Les manifestations locales se déroulent au sein du tissu conjonctif vascularisé et dépendent de la spécificité des cellules et du tissu endommagé.

Les agressions peuvent être endogènes et provenir de l'organisme lui-même ou bien être exogènes lorsque l'agression vient d'un élément extérieur au corps humain. Les lésions cellulaires et tissulaires ainsi engendrées vont initier la réaction inflammatoire. Les agents pathogènes à l'origine de ces lésions sont multiples [168]. Les infections qui correspondent à l'inoculation de micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons) au sein du corps humain sont responsables d'une inflammation. Dans ce cas, l'inflammation systémique est aussi appelée sepsis [169]. Certains agents physiques tels qu'un traumatisme, la chaleur, le froid, les radiations engendrent une réaction inflammatoire. Les agents chimiques caustiques, toxines et les venins peuvent également déclencher une inflammation. La présence de corps étrangers ainsi qu'un défaut de vascularisation par une ischémie ou une hypoxie sont aussi responsables d'une réaction inflammatoire. Enfin, les agressions dysimmunitaires par anomalie de la réponse immunitaire comme les allergies et les maladies auto-immunes sont pourvoyeurs d'inflammation [168].

Il faut noter que plusieurs causes sont parfois associées dans le déclenchement d'une réaction inflammatoire. Dans la majorité des cas, la réaction inflammatoire est « aspécifique » et fait intervenir des mécanismes de réparation tissulaire via l'activation de l'immunité innée (voir paragraphe sur la réparation du tissu musculaire squelettique). Cependant, un même agent pathogène peut parfois être à l'origine de réactions inflammatoires différentes selon l'hôte, en particulier selon les spécificités de ses défenses immunitaires. C'est le cas des infections qui engendrent une réaction inflammatoire « spécifique » avec activation du système immunitaire inné mais aussi adaptatif [170].

L'inflammation active le système immunitaire inné et/ou acquis et fait intervenir des acteurs cellulaires, des cytokines, humoraux mais aussi les facteurs de la coagulation et le système nerveux [171–173].



Suite à une agression, l'inflammation a pour objectif d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Ce processus est généralement bénéfique [173]. Toutefois, l'inflammation peut parfois être délétère de part des anomalies de modulation du processus inflammatoire tel qu'une altération quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation, ou encore par l'agressivité de l'agent pathogène, du siège de l'inflammation ou de sa persistance au sein du tissu endommagé [174]. C'est par exemple le cas des facteurs d'agression cérébrale secondaire d'origine systémique survenant après un traumatisme crânien [175]. Il est probable que les ossifications hétérotopiques acquises soient également issues d'un processus inflammatoire excessif ou erroné [145,176]. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les patients avec POAN cumulent plusieurs causes d'inflammation (infections, traumatismes, ischémies...) pouvant conduire à un haut niveau d'inflammation locale mais aussi systémique.

IV. Recherche fondamentale et POAN

Comme d'autres auteurs, nous pensons que la formation de POAN au sein du tissu musculaire chez des patients atteints d'une pathologie du SNC correspond à un processus de régénération aberrant des cellules musculaires. Nous allons voir dans ce chapitre que la lésion musculaire apparait comme essentielle à l'initiation du processus de régénération cellulaire anarchique, sans que son origine ne soit connue (traumatique, inactivité par immobilisation, médicamenteux, contexte septique). Par ailleurs, nous verrons que des facteurs cellulaires et moléculaires à l'origine d'une inflammation locale mais aussi systémique, jouent un rôle clef dans l'activation des progéniteurs musculaires vers la formation de POAN. Nous commencerons par aborder, dans cette partie, les mécanismes de régénération musculaire et d'ostéogénèse en conditions physiologiques avant de développer les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue de POAN.

1. Conditions physiologiques

1.1 Régénération du muscle strié squelettique

1.1.1 Muscle strié squelettique sain

Le muscle strié squelettique est majoritairement composé de fibres musculaires, de longues cellules cylindriques contenant des myofibrilles, qui elles-mêmes, renferment des myofilaments. Ce tissu est responsable de la contraction musculaire qui génère le mouvement (Figure 10).

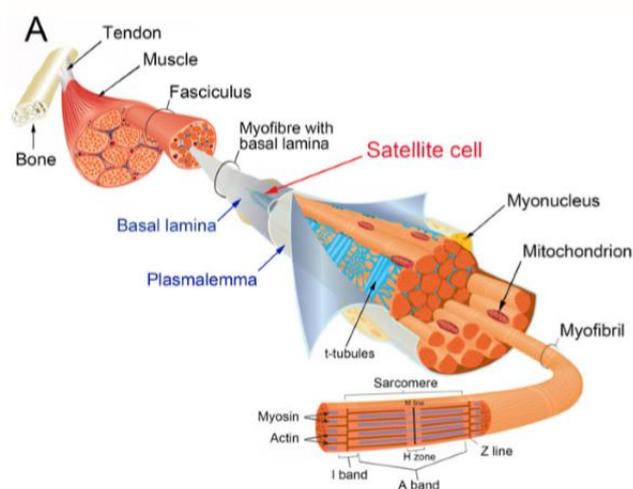


Figure 10. Structure d'un muscle squelettique.

Le plasmalemma, entouré par la lamina basale, est la membrane plasmique qui délimite chaque fibre musculaire. Une myofibre contient une multitude de noyaux localisés à la périphérie des myofibres. Le tubule T ou tubule transversal est une invagination de la membrane plasmique permettant de conduire le potentiel d'action musculaire jusqu'au cœur de la myofibre. Les filaments des sarcomères

sont composés de protéines : myosine, actine, troponine et tropomyosine. Figure extraite de l'article de Relaix and Zammit [177].

Entre la fibre musculaire et la matrice extracellulaire (nommée membrane basale) se retrouvent les cellules satellites qui sont quiescentes dans un muscle sain et qui sont responsables de la majorité de la régénération musculaire à la suite d'une blessure [178]. Un autre précurseur cellulaire des fibres musculaires est la cellule interstitielle et plus particulièrement les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAP). Contrairement aux cellules satellites situées sous la lamina basale des myofibres, les FAP sont localisés dans l'espace interstitiel entre les fibres musculaires [179]. D'autres types cellulaires se retrouvent dans l'espace interstitiel du muscle comme les mastocytes, généralement à proximité des vaisseaux sanguins, certains monocytes sanguins dits patrouilleurs, et les macrophages résidents, au sein de l'épimysium et du périmysium (Figure 11) [180].

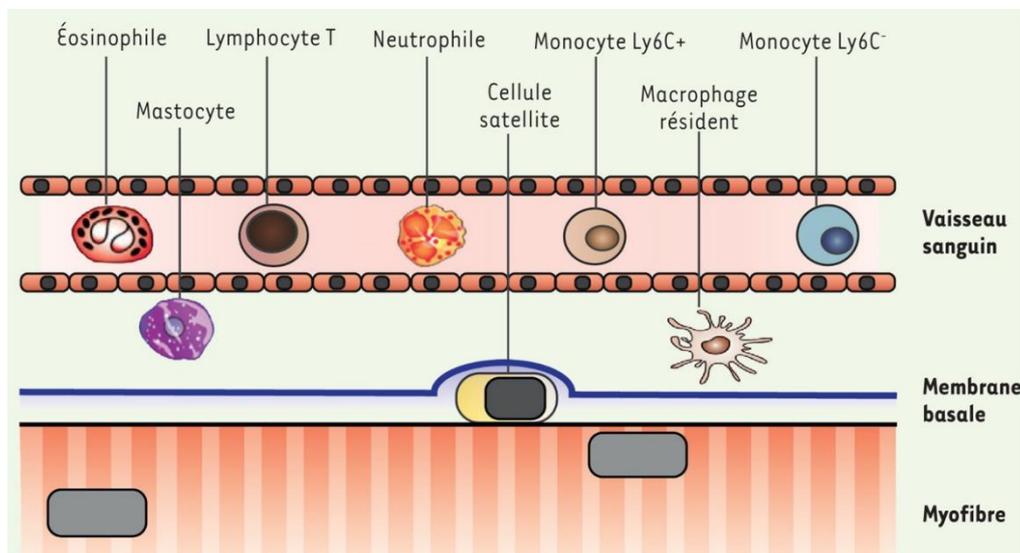


Figure 11. Leucocytes dans le muscle squelettique sain.

Extrait de l'article de Dufresne et coll. [181]

La fonction et la régulation des macrophages résidents dans le tissu musculaire sont mal caractérisées. Dans le muscle sain, le maintien de la population de macrophages résidents ne dépend pas du recrutement des monocytes circulants, mais plutôt de leur capacité d'auto-renouvellement [182]. Dans différents tissus, les macrophages résidents participent à la préservation de l'homéostasie ainsi qu'au débridement et au remodelage tissulaire [183]. Dans le tissu musculaire, ces cellules agissent comme des sentinelles. Elles perçoivent les perturbations de l'homéostasie tissulaire et favorisent le recrutement des leucocytes sanguins [184].

Plusieurs types de lésions peuvent affecter l'intégrité et la fonction musculaires tels que les claquages, les contusions, les coupures, l'atrophie, les chocs septiques et les pathologies. Suite à une atteinte musculaire, il existe une première phase de dégénérescence musculaire nécrotique et inflammatoire

puis une phase de régénération tissulaire.

1.1.2 Dégénérescence musculaire

La dégénérescence musculaire débute dès les premières minutes qui suivent la blessure par la nécrose des fibres musculaires lésées. Il existe également une réaction inflammatoire qui participe au nettoyage du tissu endommagé et favorise le retour à l'homéostasie. L'initiation, le développement et la résolution de l'inflammation nécessitent l'interaction complexe et coordonnée de différentes cellules inflammatoires [185]. Elles affectent non seulement le comportement des autres types de cellules immunitaires, mais également le comportement des cellules myogéniques (Figure 12).

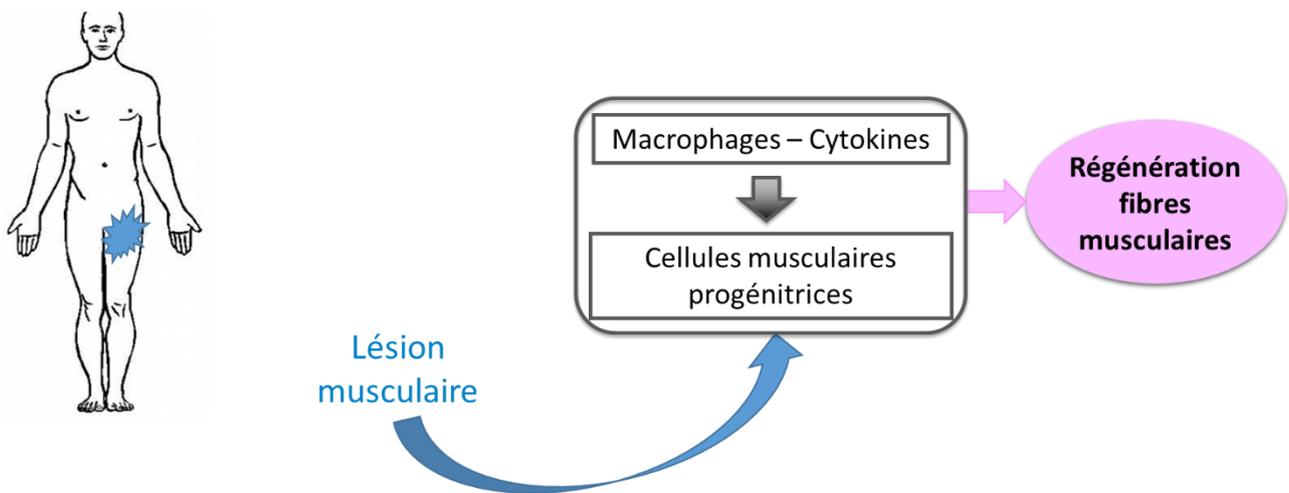


Figure 12. Schématisation des mécanismes physiologiques de réparation musculaire après un traumatisme local.

a) Les cytokines

Le tissu endommagé libère de nombreuses molécules : des débris de matrice extracellulaire mais aussi des éléments intracellulaires comme l'ADN, des heat shock proteins (HSP, protéines de choc thermique) et la protéine associée à la chromatine HMGB1 (high-mobility group box 1). Ces molécules, lorsqu'elles sont libérées et présentes dans le milieu extracellulaire, sont nommées damage-associated molecular patterns (DAMP, également appelées alarmines). Cette phase nécrotique active la cascade du complément et induit les réponses inflammatoires [186]. En effet, ces DAMP sont détectées par les macrophages sentinelles qui réagissent rapidement en stimulant les autres cellules immunitaires et en démarrant le nettoyage de la zone endommagée.

b) Les cellules

Les neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires à infiltrer le muscle lésé et leur nombre ne cesse d'augmenter jusqu'à 6 heures post-lésion [187]. Ils sont à l'origine de la libération de cytokines qui vont influencer le déroulement de l'inflammation. La sécrétion de cytokines comme MIP-1 α (macrophage-inflammatory protein 1 α) et MCP-1 (monocyte chemo-attractant protein-1) par les

neutrophiles favorise ainsi le recrutement des monocytes sanguins [188].

L'infiltration musculaire des neutrophiles est suivie par l'invasion séquentielle de deux sous-populations distinctes de macrophages qui deviennent à leur tour les cellules prédominantes du muscle endommagé [189]. Les premiers macrophages qui infiltrent le muscle dans les 24 à 48 heures suivant la lésion, expriment à leur surface le marqueur CD68 (cluster of differentiation 68) mais pas la protéine CD163 (CD163-). Ces macrophages CD68+/CD163- sont considérés comme pro-inflammatoires et sécrètent des cytokines telles que TNF α , le macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2), le cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) et l'IL-1 (interleukine 1) [180,185,190]. Ils nettoient également la zone nécrotique en phagocytant les débris cellulaires. Ces macrophages favorisent aussi le recrutement leucocytaire. Enfin, ils affectent les cellules myogéniques en favorisant la prolifération des myoblastes et en réprimant leur différenciation, de par l'environnement pro-inflammatoire qu'ils induisent [191]. La seconde population de macrophages exprime CD163 mais pas CD68 (CD68-/CD163+). Ils envahissent le muscle avec un pic de concentration à 2 et 4 jours post-blessure et restent dans le muscle endommagé jusqu'à la fin de l'inflammation. Ces macrophages CD68-/CD163+ ont un rôle anti-inflammatoire en sécrétant des facteurs comme l'IL-10 et le TGF- β (tumor growth factor-beta) [188]. Leur rôle est de faciliter la prolifération et la différenciation des cellules satellites nécessaire au processus de régénération tissulaire [192,193]. Les deux phases pro- et anti-inflammatoires peuvent se chevaucher et les deux sous-populations de macrophages se retrouvent alors, au sein de la même lésion musculaire, au même moment [194].

Récemment, un effet favorable sur la régénération musculaire d'un autre type de granulocytes, les éosinophiles, a été montré *via* leur capacité à produire de l'IL-4 [195]. La sécrétion importante de cette cytokine anti-inflammatoire influence le destin cellulaire des FAP. L'IL-4 libérée par les éosinophiles favorise donc la prolifération des FAP, inhibe leur différenciation en adipocytes et augmente leur capacité de phagocytose des débris tissulaires permettant une meilleure régénération musculaire [195].

Les mastocytes sont particulièrement importants dans les premiers instants de la réaction inflammatoire. Ils sont capables de sécréter des facteurs préformés et accumulés dans leurs granules comme le TNF- α , l'histamine et la tryptase. Les mastocytes peuvent également synthétiser *de novo* une panoplie d'autres cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-1 β , etc. [196]. En plus de leur rôle important dans le recrutement des leucocytes sanguins, ces différentes cytokines peuvent favoriser l'activation et la prolifération des myoblastes [180,197].

L'accumulation transitoire et contrôlée de leucocytes pro-inflammatoires est donc nécessaire afin de

bien coordonner l'activité des cellules myogéniques et permettre une régénération musculaire optimale.

1.1.3 Régénération musculaire (Figure 13)

Suite à la dégénérescence musculaire, le processus de régénération prend place dès la première semaine après la lésion avec un pic d'activité au bout de la deuxième semaine. Une caractéristique de cette phase est la prolifération cellulaire.

À la suite d'un dommage du tissu musculaire, s'enclenche un processus myogénique permettant la régénération du tissu lésé qui dépend majoritairement de l'activité des cellules satellites [178]. Ces cellules s'activent en réponse au traumatisme et prolifèrent rapidement générant un grand nombre de cellules myogéniques, les myoblastes, qui se différencient en myocytes qui fusionnent pour former les myotubes (fibres musculaires immatures) [178]. En plus des cellules satellites, dans le muscle squelettique adulte, résident de nombreuses populations cellulaires jouant un rôle dans le processus de régénération. Notamment, des cellules interstitielles associées ou non aux vaisseaux présentent peu ou pas d'activité mitotique au repos, mais sont capables de proliférer et de se disperser dans le tissu musculaire en réponse à une blessure mais aussi en conditions pathologiques (Duschenne et très probablement POAN) [180,198,199].

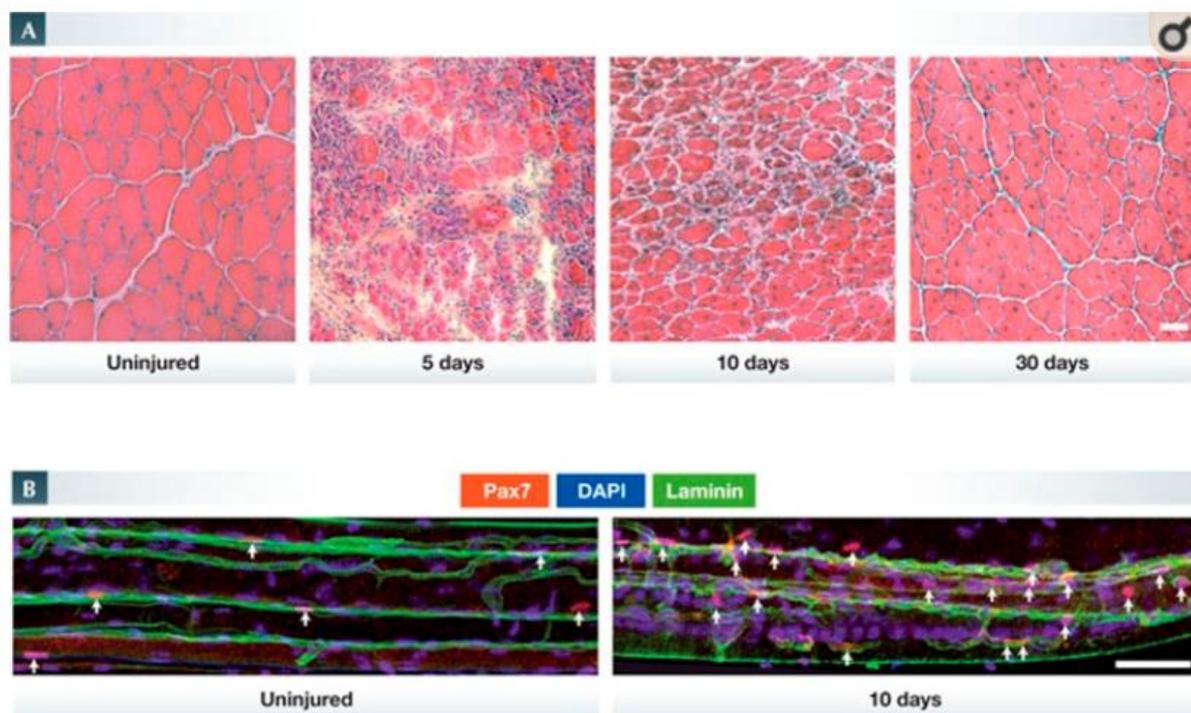


Figure 13. Coupes histologiques de la régénération musculaire de muscle strié squelettique de souris endommagé par de la cardiotoxine.

(A) Changement histologique de la régénération musculaire au cours du temps. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine d'un muscle strié squelettique endommagé et régénération tissulaire à 5, 10 et 30 jours après injection intramusculaire de cardiotoxine. Au 5^{ème} jour, la régénération du muscle est essentiellement réduite à la présence de cellules mononucléaires, alors qu'à 10 jours, on assiste à

un rétablissement des myofibres multinuclées. On peut noter que les noyaux cellulaires des cellules endommagées sont localisés à la périphérie alors qu'ils se trouvent au centre des cellules dans le muscle régénéré. Echelle, 50 µm. **(B)** Vue longitudinale de l'ensemble du tissu musculaire endommagé (gauche) et en cours de régénération (droite). Immunomarquage de la matrice extracellulaire via la protéine Laminin (vert) qui marque la membrane basale entourant les myofibres et les capillaires. Dans les conditions de régénération tissulaire, la prolifération des cellules satellites peut être observée par l'augmentation du nombre de cellules exprimant Pax7 (rouge). DAPI marque le noyau cellulaire (bleu) et révèle accessoirement des cellules satellites dans leur niche. Echelle, 50 µm. Figure extraite de l'article de Bentzinger et coll. [180]

1.1.4 Phase de remodelage

La phase de remodelage des fibres musculaires commence pendant la deuxième semaine qui suit la blessure. Une fois la fusion des cellules myogéniques complète, la taille des myofibres nouvellement formées augmente et les noyaux centraux migrent à la périphérie des fibres. Au final, le tissu musculaire régénéré est identique à celui du muscle non blessé d'un point de vue morphologique mais aussi fonctionnel.

1.2 Ostéogénèse physiologique [200,201]

1.2.1 Tissu osseux sain

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé vascularisé et innervé. Il est organisé de telle sorte qu'il confère une rigidité et une résistance adaptées à son rôle prépondérant dans le corps humain. Il a quatre rôles principaux : (1) il possède une fonction biomécanique (station debout, locomotion, insertion des tendons) ; (2) il assure la protection des organes vitaux (encéphale dans la boîte crânienne, cœur et poumons dans la cage thoracique) ; (3) il a un rôle métabolique car il assure l'homéostasie phosphocalcique ; (4) il possède une fonction hématopoïétique puisqu'il est le lieu de la création et du renouvellement des cellules sanguines.

a) Architecture

Tous les os du squelette adulte sont constitués de deux types de tissus osseux présentant des architectures différentes : le tissu osseux compact, Haversien ou os cortical et le tissu osseux spongieux ou os trabéculaire (Figure 14).

L'os compact correspond à la partie périphérique des os. Il est composé d'ostéons, aussi nommé système de Havers qui sont de petites unités osseuses cylindriques (entre 0,1 et 1 mm de diamètre, longueur maximale de 1 cm) (Figure 14). Au centre de ces unités osseuses se trouve le canal de Havers, contenant un pédicule neuro-vasculaire, autour duquel sont disposées des lamelles concentriques de tissu osseux minéralisé. Les canaux de Wolkman sont perpendiculaires aux ostéons ce qui permet de les relier entre eux.

L'os spongieux, quant à lui, possède une architecture alvéolaire comparable à celle d'une éponge (Figure 14). Il constitue l'intérieur des épiphyses des os longs et la partie centrale des os courts et plats.

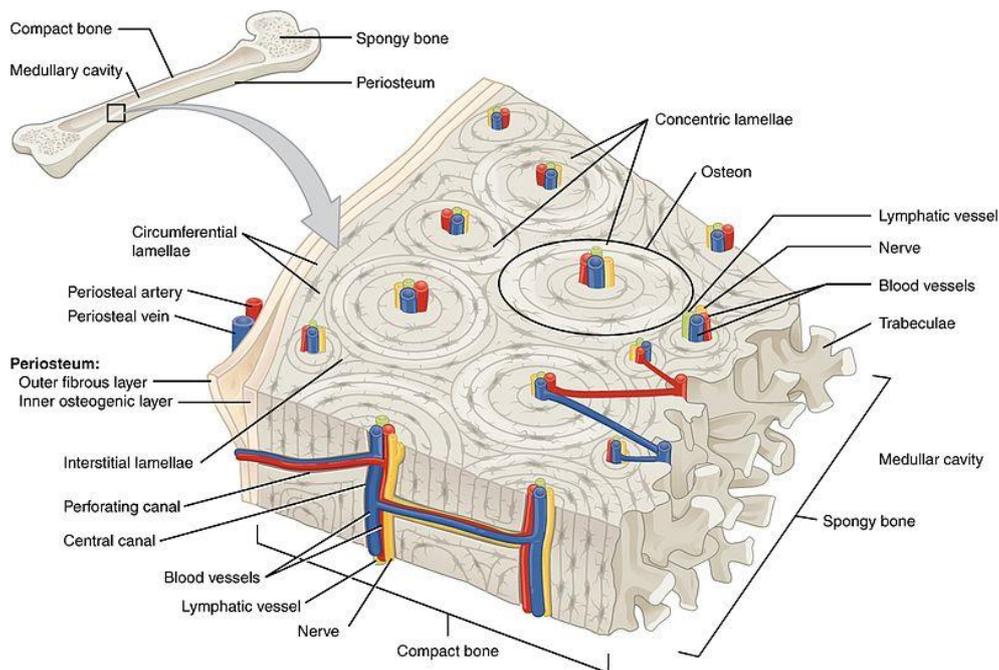


Figure 14. Représentation schématique de l'os compact (Haversien) et os spongieux (trabéculaire).

Extrait de www.pediaa.com

b) Matrice extracellulaire

L'os est un tissu conjonctif particulier car cette matrice est minéralisée. Elle est imprégnée de sels de calcium et de phosphate sous forme de cristaux. Le tissu osseux est constitué de plusieurs éléments : l'eau (9%), une partie inorganique minéralisée (phase minérale 69%), et une phase organique (22%) produite par les ostéoblastes. Cette composition unique confère au tissu osseux des propriétés mécaniques spécifiques que sont la solidité du tissu, liée aux cristaux de la phase minérale, et la flexibilité, apportée par l'eau et la matrice organique.

La matrice organique, aussi appelée ostéoïde, est composée de 95% de fibres de collagène de type I. Leur disposition entrecroisée forme un réseau complexe qui favorise l'adhésion et la prolifération cellulaire mais aussi la fixation de l'hydroxyapatite et la minéralisation du tissu. Ce composé confère à l'os sa résistance à la traction. D'autres protéines sont retrouvées dans la matrice organique telles que le TGF β (Transforming Growth Factor), les BMP mais aussi différentes glycoprotéines structurales non collagéniques comme les protéoglycanes. Ils sont constitués de nombreux glycosaminoglycanes liés à un axe protéique principal. Grâce à leur propriété de rétention d'eau, les protéoglycanes forment des gels hydratés permettant le passage des éléments nécessaires entre le sang et les cellules du tissu osseux et sont également responsables des propriétés viscoélastiques du tissu osseux. L'ostéocalcine,

l'ostéonectine et les sialoprotéines sont également présentes dans la matrice organique.

La phase minérale confère à l'os sa rigidité et sa dureté. Elle est constituée de sels minéraux dont le calcium et le phosphate sont les plus abondants. Elle est formée de cristaux qui s'organisent sous forme de plaques hexagonales, ensuite associées en lamelles sur lesquelles se répartissent les ions calcium, phosphate et hydroxyle.

c) Les BMP

Sept de ces protéines, de BMP-2 à BMP-8 présentent des analogies de séquences et font partie de la superfamille des TGF- β . De plus, à l'intérieur de cette famille, on distingue 3 sous-groupes : BMP-2 et 4, BMP-3, BMP-5, 6 et 7 [202]. Les BMP-2 et 4 sont les plus connues car les plus étudiées. Ces protéines ont été découvertes initialement devant leur capacité à induire la formation des os et cartilages. Elles sont aujourd'hui considérées comme de véritables chefs d'orchestre de la chondrogenèse et de l'ostéogénèse lors de l'embryogénèse mais aussi tout au long de la vie. Les BMP peuvent également induire le maintien de la multipotence, ou, inversement, la différenciation des cellules souches. Ces protéines participent au bon fonctionnement des niches hématopoïétiques directement mais aussi indirectement, par action sur l'environnement [203]. Les BMP modulent le processus de réparation des astrocytes dans le SNC en cas de lésion [204]. Une hypothèse pouvant expliquer leur implication dans les POA serait le passage de BMP dans le sang en cas de lésion neurologique par rupture de la barrière hémato-méningée. Dans le cas des POA, une hypothèse Leur rôle physiologique essentiel dans l'architecture tissulaire explique l'apparition de maladies lorsque le signal médié par les protéines du BMP est pathologique. En cas, d'hyperactivation de la voie du BMP, on peut voir apparaître des pathologies osseuses (nous avons vu précédemment l'exemple de la FOP) mais aussi cancéreuses comme les adénocarcinomes de l'œsophage ou de la partie proximale du tube digestif [205]. Par opposition, l'absence de voie de signalisation du BMP est un important facteur de progression du cancer du côlon [206]. La voie de signalisation du BMP joue aussi un rôle dans la déminéralisation osseuse. Les BMP ont également donné lieu à des thérapeutiques stimulant l'ostéogénèse. Les BMP-2 et 7 recombinant humains sont actuellement utilisés pour certains cas de pseudarthrose et de pathologies odontologiques [207,208].

d) Les cellules osseuses

On différencie trois catégories de cellules directement impliquées dans l'ostéogénèse (formation, dégradation, remodelage).

Les ostéoblastes (Figure 15: A, D) sont responsables de la formation de la matrice organique [209]. Les ostéoblastes déposent l'ostéoïde le long de l'interface entre des ostéoblastes eux-mêmes et l'os déjà formé. Leur membrane plasmique est riche en PAL. Cette enzyme peut d'ailleurs être dosée car son

taux reflète la formation osseuse mais son élévation n'est pas constante. Dans le cas des POAN, par exemple, son dosage ne permet pas de détecter de façon systématique la formation d'une POAN et n'est donc pas recommandé en pratique clinique. Les ostéoblastes produisent de façon spécifique le collagène de type I, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse [2]. Ils synthétisent également des BMP qui sont des facteurs de croissance appartenant à la famille des TGF- β et induisent l'ostéogenèse. Les ostéoblastes participent également au processus de résorption osseuse en régulant l'activité des ostéoclastes. Enfin, il existe une catégorie particulière d'ostéoblastes, les cellules bordantes. Elles ont une morphologie très allongée et aplatie et n'ont plus d'activité métabolique, ce sont des ostéoblastes au repos. Les cellules bordantes recouvrent les surfaces osseuses dites inactives et sont unies entre elles et aux ostéocytes par des jonctions communicantes. Elles constituent une barrière fonctionnelle entre l'os minéralisé et la moelle osseuse présente dans la cavité médullaire. Elles peuvent redevenir actives lorsqu'elles sont stimulées. L'activité des ostéoblastes diminue au fur et à mesure de la synthèse et de la minéralisation de la matrice, ils peuvent alors se transformer en ostéocytes ou en cellules bordantes, ou bien, mourir par apoptose.

La différenciation terminale des ostéoblastes donne naissance aux ostéocytes (Figure 15 B, E). Ces cellules sont prisonnières au sein la matrice organique minéralisée, dans des logettes appelées ostéoplastes. Les ostéocytes permettent le maintien de la MEC et participent à l'homéostasie de la calcémie [210]. Ostéoblastes et ostéocytes restent en contact grâce à l'établissement d'un système de jonctions communicantes qui sont des prolongements cytoplasmiques traversant la MEC minéralisée. Ces mêmes prolongements de cytoplasme permettent aux ostéocytes d'être reliés entre eux et leur approvisionnement en nutriments grâce à des contacts avec des vaisseaux sanguins intra-osseux.

Les ostéoclastes (Figure 15 C, F) sont des cellules multi-nucléées et de grande taille, responsables de la dégradation de la matrice minéralisée par un mécanisme appelé résorption osseuse [211]. Elles sont, par conséquent, présentes dans les zones de dégradation du tissu osseux. Afin d'assurer la résorption osseuse, les ostéoclastes produisent un environnement acide afin de dissoudre les composants inorganiques de l'os. Par le biais d'enzymes protéolytiques, ils dégradent ensuite la composante organique de la MEC formant des lacunes de résorption osseuse, appelées lacunes de Howship. Les ostéoclastes sont des cellules particulièrement mobiles. Elles sont capables de se déplacer d'un site de résorption à un autre, en suivant les travées osseuses. Leur durée de vie moyenne est de deux semaines. Par la suite, les ostéoclastes entrent en apoptose. Les ostéoclastes sont les acteurs principaux de la résorption osseuse et jouent un rôle essentiel dans le remodelage osseux.

Enfin, les macrophages sont présents dans l'endosteum, le periosteum, l'os trabéculaire et cortical chez l'homme et l'animal [198,199]. Ils ont également été décrits comme contribuant, par le biais de la différenciation des ostéoblastes, à l'augmentation de la maturation et de la minéralisation osseuse [212,213]. Ces macrophages sont appelés ostéomacs. Leur déplétion chimique entraîne, chez la souris,

une perte rapide des ostéoblastes et stoppe la formation osseuse, prouvant que les ostéomacs sont nécessaires au maintien de la fonction des ostéoblastes et à l'ostéogénèse [214]. Les ostéomacs ont aussi un rôle de maintien de la fonction des niches de cellules souches hématopoïétiques [214].

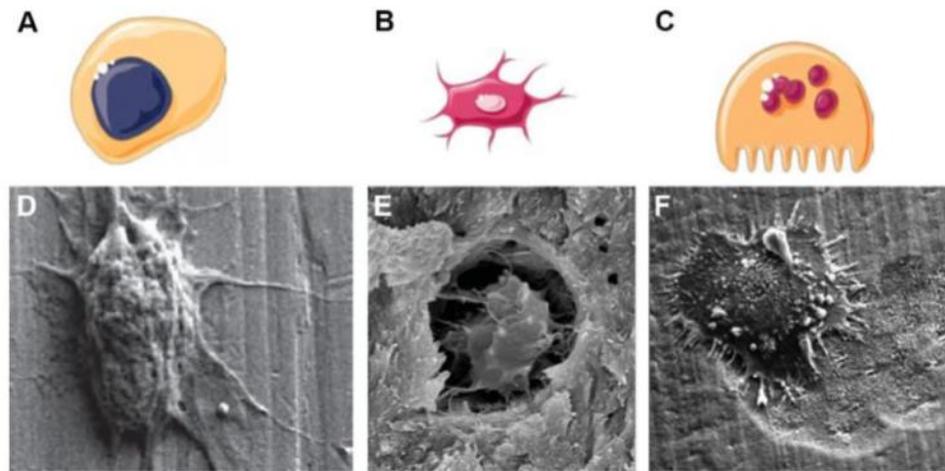


Figure 15 (A, D) Ostéoblastes, (B, E) ostéocytes, et (C, F) ostéoclastes

Schématisés et observés au Microscope. Figure extraite de la thèse de Depalle [215].

1.2.2 Ostéogénèse

Il existe 3 types d'ostéogénèse : l'ossification primaire au stade de développement embryonnaire ; l'ossification secondaire à partir d'un tissu osseux déjà constitué qui conduit à la maturation osseuse (os lamellaire) par succession de résorption ostéoclastique et de reconstruction ostéoblastique ; et l'ossification tertiaire, chez l'adulte qui correspond au remodelage osseux permanent, permettant l'adaptation du squelette à la croissance, au maintien de l'équilibre phosphocalcique et aux nouvelles contraintes mécaniques qui peuvent apparaître au cours de la vie. Dans le cas particulier des fractures osseuses, les deux processus d'ossification endochondral et intramembranaire sont essentiels pour la guérison.

Nous développerons ici uniquement l'ostéogénèse primaire qui est en lien avec les premières étapes de la constitution des POAN.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction générale, il existe deux voies ostéogéniques contribuant à l'ostéogénèse primaire : l'ossification endochondrale et intramembranaire. C'est pendant le développement embryonnaire entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine que débute l'ostéogénèse. Avant cette période, le squelette n'est constitué que de cartilage hyalin et de membranes fibreuses. Le tissu osseux est caractérisé de tissu de remplacement car il s'installe à la place d'un autre tissu préexistant.

a) Ossification endochondrale [2,216]

Ce type d'ossification est caractérisée par le remplacement du cartilage hyalin. Le cartilage ne se transforme pas directement en os mais va disparaître au fur et à mesure de l'ostéogénèse. L'ossification endochondrale est essentiellement responsable de l'ossification des os longs.

- La première étape intéresse le centre de la diaphyse de ce que sera le futur os long. Elle consiste en la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes pour constituer un squelette cartilagineux. Peu de temps après, va se former le périchondre, une membrane qui va venir recouvrir le cartilage nouvellement formé (Figure 16, image de gauche).

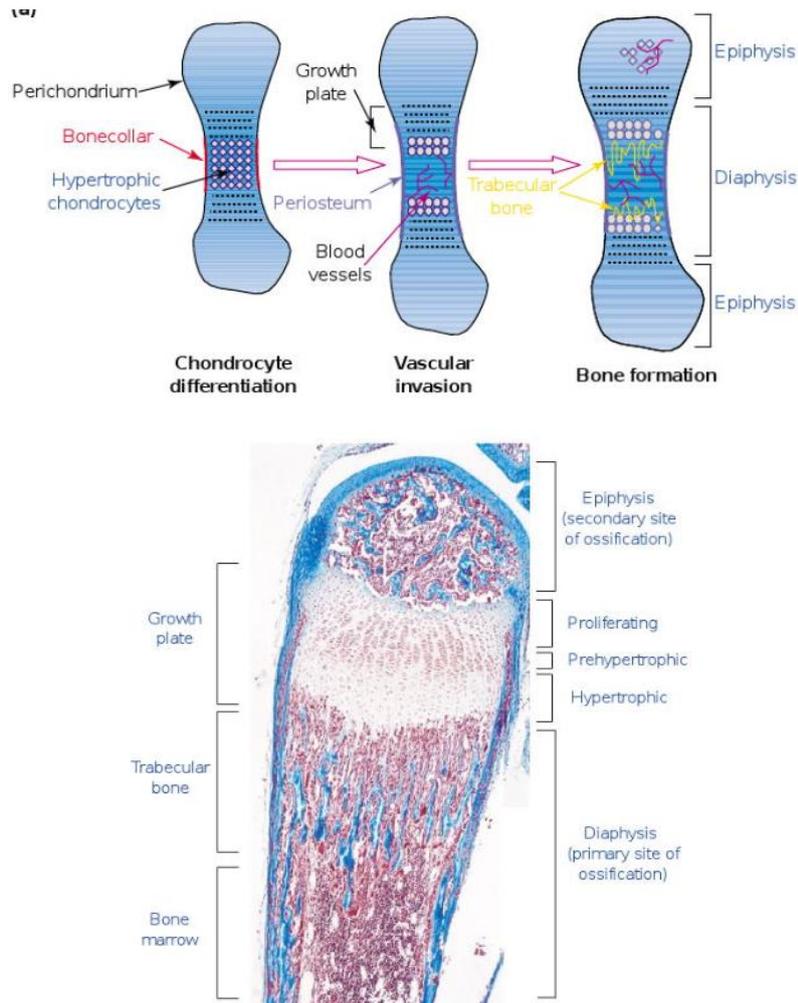


Figure 16. Différentes étapes de l'ossification endochondrale.

Extrait de l'article de Ortega et coll. [216]

Au fur et à mesure que la matrice cartilagineuse progresse, la taille des chondrocytes augmente, on appelle cette zone, le cartilage hypertrophique. En effet, les chondrocytes deviennent globuleux et hypertrophiés, avec un cytoplasme qui se charge de glycogène, de lipides et des phosphatases alcalines,

et finissent par dégénérer. Parallèlement, la matrice cartilagineuse est réduite à de très minces travées irrégulières, qui se chargent de calcium et de phosphatases. Ce phénomène mène à un blocage d'approvisionnement des nutriments aux cellules, conduisant à leur mort. On assiste alors à une désintégration du tissu cartilagineux au sein du cartilage hypertrophique, permettant la pénétration de vaisseaux sanguins.

- L'invasion vasculaire se fait dans les espaces laissés libres et amène des cellules conjonctives peu différenciées appelées pré-ostéoblastes. Ces cellules se différencient ensuite en ostéoblastes qui vont, à leur tour, produire de la matrice osseuse. En périphérie de la diaphyse, c'est une ossification primaire intramembranaire qui conduit à la formation du périoste qui supprime le périchondre (Figure 16 image du milieu).

- Il se développe ensuite, au centre de la diaphyse, un centre d'ossification primaire. L'ensemble de ces étapes constitue le stade de la pré-ossification, qui va poursuivre son développement et progresser de façon ordonnée. Il existe une ligne d'ossification, très nette, à la limite entre le tissu cartilagineux hyalin et le tissu osseux primaire néoformé (os trabéculaire). Le centre de la diaphyse va progressivement être envahi de moelle osseuse hématopoïétique (Figure 16 image de droite).

Dans les deux épiphyses, la pénétration vasculaire, induit la formation de deux centres d'ossification secondaires suivant les mêmes étapes décrites précédemment (Figure 1 image de droite et du bas).

Le cartilage de conjugaison (aussi appelé cartilage de croissance) métaphysaire des os longs correspond à une autre limite qui se situe entre diaphyse et épiphyse. Cette zone assure la croissance en longueur des os. Face à la ligne d'ossification, le cartilage hyalin est organisé et constitué de façon proximo-distale, par une zone de cartilage hypertrophique, une zone de cartilage sérié et une zone de réserve de cartilage basal (Figure 17). Entre les chondrocytes, les travées cartilagineuses deviennent progressivement plus minces, irrégulières et se chargent de calcium. Le cartilage hypertrophique, en première ligne de la ligne d'ossification, est en contact avec des axes conjonctivo-vasculaires qui pénètrent les logettes cartilagineuses. Les pré-ostéoblastes amenés par la circulation sanguine, se différencient alors en ostéoblastes qui produisent la matrice osseuse et contribuent à sa minéralisation. Ce processus aboutit à la formation de travées d'os primaire (os trabéculaire), bordées en périphérie d'ostéoblastes et contenant dans leur épaisseur des ostéocytes. A distance de la ligne d'ossification, se trouve la ligne de résorption où les ostéoclastes viennent rapidement résorber l'os primaire pour donner lieu à l'ossification secondaire (Figure 17).

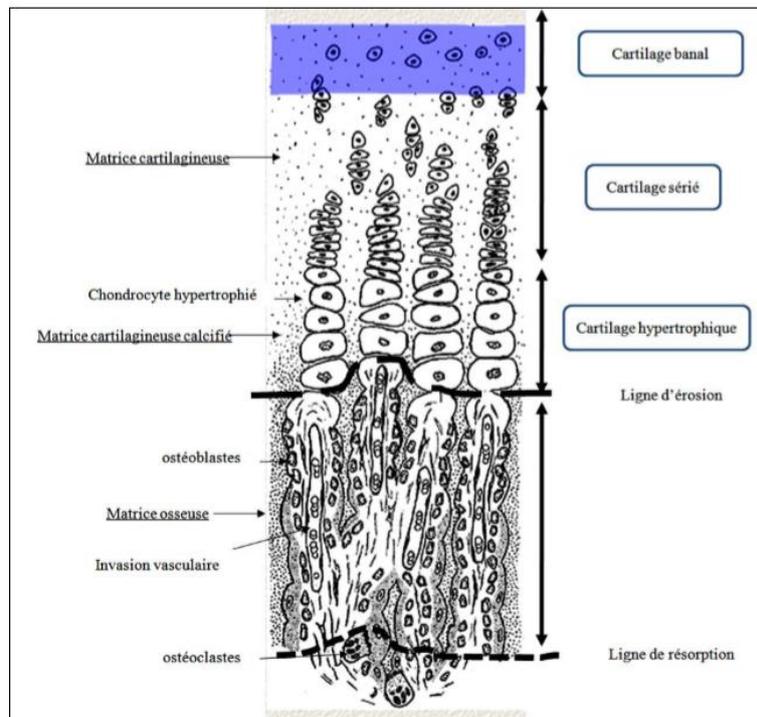


Figure 17. Constitution des cartilages de conjugaison.

Extrait <http://www.facmed-univ-oran.dz>

Lorsque le squelette fœtal est complètement formé, le cartilage subsiste uniquement en regard des articulations pour constituer les surfaces articulaires et au sein des métaphyses, dans les cartilages de conjugaison, pour assurer la croissance longitudinale de l'os. Après la naissance, la même séquence d'évènement apparaît dans les régions épiphysaires constituant des centres d'ossification secondaires. Après la puberté, les chondrocytes arrêtent de se multiplier, les cartilages de conjugaison disparaissent, la croissance est terminée.

b) Ossification intramembranaire [1]

L'ossification intramembranaire se fait directement à partir de feuillets mésenchymateux, indifférenciés, présents dans le tissu conjonctif. Ce processus d'ossification est responsable de la formation des os plats de la face, de la voûte crânienne et des clavicules. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la formation du périoste des os longs se fait à partir d'une ossification intramembranaire.

L'ostéogénèse est plus rapide que pour l'ossification endochondrale et démarre lorsque les fibroblastes (ou cellules mésenchymateuses) du squelette embryonnaire se rassemblent entre elles pour amorcer une différenciation cellulaire. Ces cellules peuvent suivre 2 types de voie de différenciation, soit ostéogénique, soit angiogénique. Lorsqu'elles empruntent la voie ostéogénique, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes (Figure 18). A un stade précoce, ils apparaissent d'abord en amas, appelés centres d'ossification. Les ostéoblastes élaborent une substance pré-osseuse (ostéoïde), initialement non calcifiée. La minéralisation se fait en quelques jours, au fur et

à mesure du dépôt de sels minéraux qui vont ainsi, piéger les ostéoblastes. Une fois emprisonnés, les ostéoblastes se différencient en ostéocytes et les cellules ostéogéniques environnantes poursuivent leur différenciation en ostéoblastes.

Les ostéoblastes à la surface de l'os spongieux constituent le périoste, alors que l'ostéoïde sécrété autour des capillaires donne une matrice trabéculaire plus ou moins anastomosée (os primaire primitif non lamellaire). La lamélisation de ces travées par réabsorption ostéoclastique puis par reconstruction, aboutit ultérieurement à la constitution d'os spongieux (ossification secondaire).

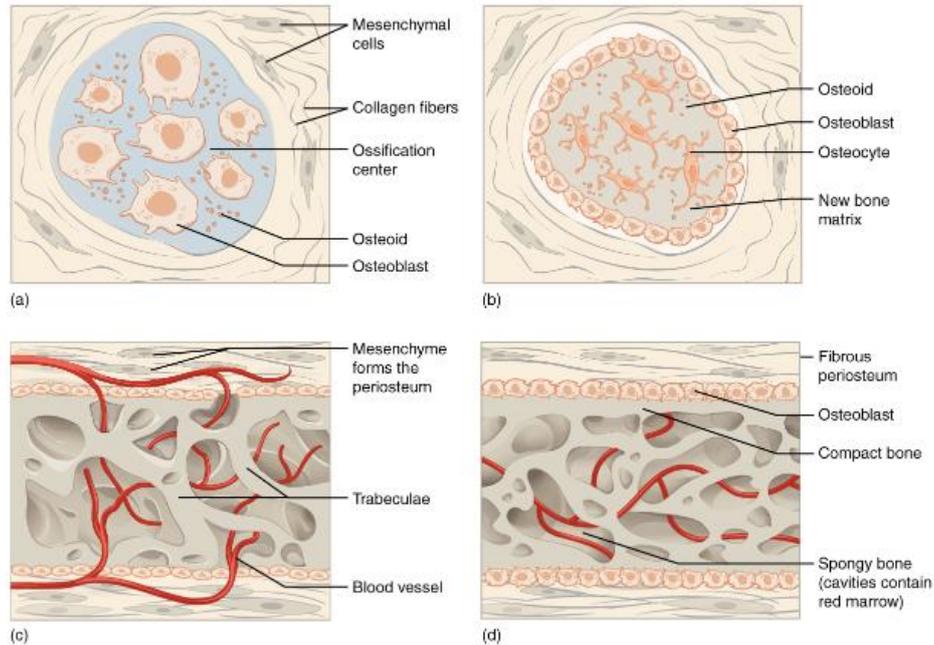


Figure 18. Les 4 étapes de l'ossification intramembranaire.

(a) Rassemblement des cellules mésenchymateuses et formation de centres d'ossification. (b) La sécrétion d'ostéoïde emprisonne les ostéoblastes qui deviennent alors des ostéocytes. (c) La matrice trabéculaire et le périosteum se forment. (d) L'os compact se développe en superficie de l'os trabéculaire et une masse de vaisseaux sanguins se condense pour former la moelle rouge. Extrait de www.opentextbc.ca

L'ossification intramembranaire débute lors des premières semaines de développement *in utero* et se poursuit jusqu'à l'adolescence. A la naissance, le crâne et les clavicules ne sont pas encore totalement ossifiés et les fontanelles ne sont pas soudées pour permettre au corps du bébé de se déformer pendant l'accouchement. Les premiers os s'ossifiant sont les os plats de la face qui atteignent leur taille adulte à la fin des poussées de croissance.

2. Conditions pathologiques et formation de POAN

Même si les POAN sont des formations osseuses ectopiques, nous allons voir que leur organisation n'est pas anarchique mais au contraire, bien structurée sur le plan cellulaire comme architectural. En revanche, les mécanismes physiopathologiques pour y parvenir semblent avoir emprunté, à un moment donné, une ou plusieurs voies aberrantes, expliquant le développement hétérotopique d'un

tel os au sein des tissus mous.

2.1 Schématisation des hypothèses physiopathologiques

Comme nous l'avons vu dans la section ci-dessus, en condition physiologique, une lésion musculaire simple se régénère classiquement en muscle. Cependant, lorsque vient s'ajouter une lésion aiguë du système nerveux central, les signaux envoyés aux cellules progénitrices du muscle et aux cellules immunitaires en charge de la régénération musculaire, sont différents conduisant à la production d'os et non de muscle (Figure 19).

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des POAN restent encore obscurs. De nombreuses équipes de cliniciens et de chercheurs travaillent à élucider les différentes étapes conduisant à la formation de POAN et POA. Il semble exister des preuves d'une interaction complexe entre des facteurs locaux et systémiques. Trois conditions paraissent nécessaires à la formation d'os ectopique: la présence de précurseurs ostéogéniques, d'un agent inducteur et un environnement permissif [217]. Comme l'ont mentionné Citak en 2012 puis Huang en 2018, nous sommes d'accord pour dire que les processus inflammatoires jouent un rôle majeur dans le développement de POAN et des POA en général [145,176]. Deux phases semblent se dissocier chez les patients suivant une atteinte du SNC. La première est une phase de « chaos » faisant immédiatement suite à l'accident où le pronostic vital peut être engagé et pendant laquelle, il existe de nombreuses complications, notamment infectieuses. C'est à ce stade de nécrose, d'hypoxie tissulaire et d'importante inflammation que s'enclenchent les premiers processus d'ostéogénèse. La deuxième phase, difficile à déterminer dans le temps, correspond plutôt à une stabilisation de l'état clinique qui diffère d'un patient à l'autre. C'est pendant cette période que vont se poursuivre les processus de maturation et de réorganisation des POAN.

Nous allons, dans la suite de ce chapitre, détailler les différentes étapes conduisant au développement de POAN en précisant pour chacune d'entre elles les avancées en matière de recherche sur les mécanismes physiopathologiques et les hypothèses restant à élucider.

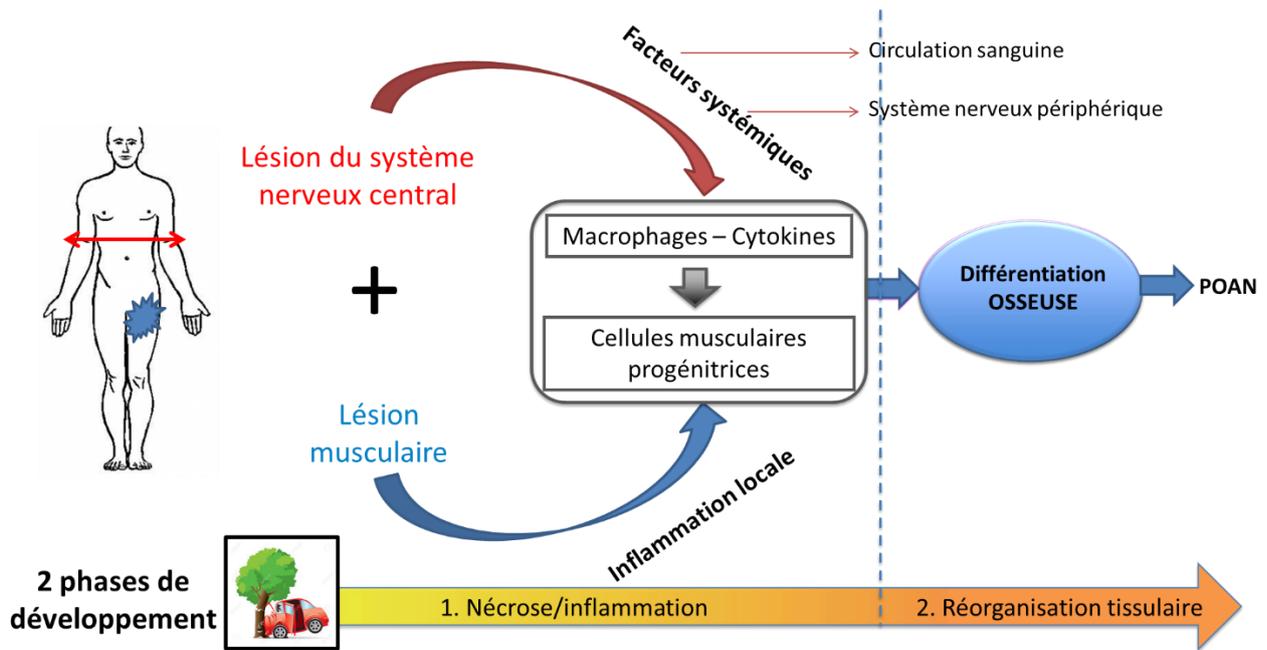


Figure 19. Schéma des hypothèses physiopathologiques de réparation musculaire conduisant à la formation de POAN dans un contexte de traumatisme local musculaire et de lésion du système nerveux central.

1^{er} temps de nécrose et inflammation locale et systémique. 2^{ème} temps de réorganisation tissulaire.

2.2 Atteinte musculaire

2.2.1 A l'échelle humaine : aspect macroscopique

Nous considérons ici le muscle comme étant le point de départ de formation des POAN mais en réalité, cette question reste entière. Les études ne sont pas formelles sur le type de tissu atteint initialement : musculaire, tendineux, adipeux ou encore de la paroi vasculaire.

Lorsqu'on regarde les examens d'imagerie et notamment le scanner, les POAN localisées à la hanche se développent de façon assez univoque, au sein du corps musculaire (Figure 20). En revanche, les POAN localisées au genou et au coude intéressent le muscle mais apparaissent aussi sous forme de « coulées » disposées entre les tendons, le tissu adipeux et la capsule articulaire (Figure 20). Ce sont d'ailleurs ces « coulées » qui forment des ponts osseux, ressentis comme gênant par les patients car ils provoquent enraidissement articulaire, douleurs et compression nerveuse.

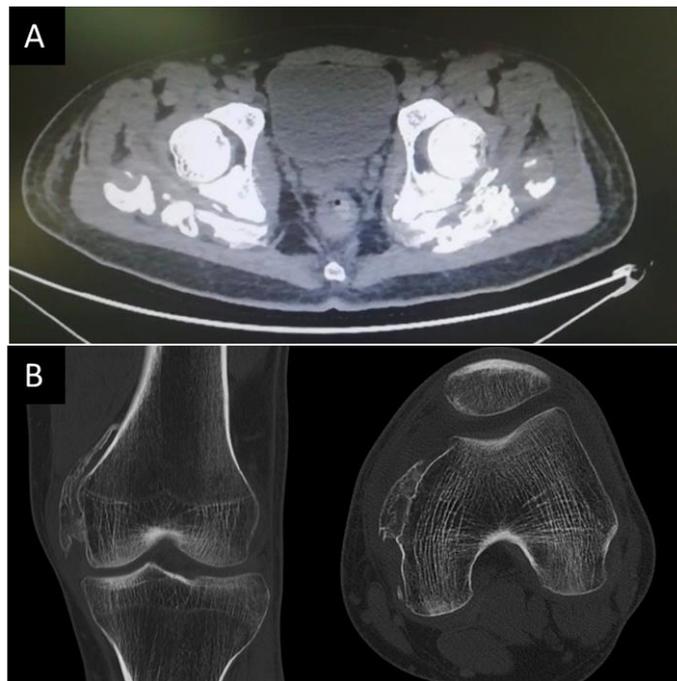


Figure 20. Localisation intra-tissulaire des POAN. (A) POAN postérolatérale bilatérale de hanche de localisation intra-musculaire dans les muscles moyen fessier. (B) POAN interne du genou dans le muscle vaste médial et extra-musculaire venant se loger entre la capsule articulaire et le ligament collatéral médial.

Des études récentes évoquent le fait que les cellules progénitrices à l'origine des POAN ne sont pas spécifiques du tissu musculaire et peuvent être présentes dans d'autres tissus tels que le tissu adipeux ou encore le tissu conjonctif des tendons. Nous développerons cette section plus bas dans la partie sur les cellules progénitrices.

2.2.2 A l'échelle animale : modèle murin induisant des OHN

Au fil des années, nous avons pu voir apparaître les limites liées aux études cliniques portant sur les POAN. La méthodologie rétrospective amène à certains biais comme l'hétérogénéité des données et l'émergence de facteurs confondants. Il est donc apparu indispensable de créer un modèle animal développant des OH afin de se rapprocher au plus près de la pathologie humaine et ainsi d'étudier plus finement les mécanismes conduisant à cette complication. Nous parlerons d'OH dans les modèles animaux car, comme nous le verrons, la localisation des ossifications n'est pas péri-articulaire. Dans le cas d'OH neurogènes, nous les appellerons OHN.

Il existe actuellement 3 modèles murins développant des OHN mais tous ont utilisé un procédé différent.

- Kang et coll. ont élaboré en 2014, le tout premier modèle de souris développant des OHN [218]. Après laminectomie, une contusion médullaire était réalisée en T10 par le lâcher d'un poids de 35 g d'une hauteur de 50 mm [219] occasionnant une lésion médullaire de 1,8 mm de profondeur. Cette

lésion était responsable d'une paraplégie complète des souris. Du BMP-2 était injecté en intramusculaire dans le quadriceps des souris aux doses de 0,25 et 0,50 µg. Le BMP-2 était préparé à partir de BMP-2 humaine recombinante mélangée avec 10 µL d'un complexe d'héparine-chitosan ionique. Ce procédé avait déjà permis d'induire des OHN chez des rats sans lésion neurologique [220]. L'injection intramusculaire se faisait directement après la contusion médullaire et avant que les souris ne se réveillent de l'anesthésie.

L'ensemble des souris avec contusion médullaire ayant reçu 0,25 µg et 0,50 µg présentaient des OHN dans la patte injectée de BMP-2.

Ce modèle comporte 2 limites. La première est le choix de la lésion médullaire par contusion qui peut se révéler partielle et donner lieu à une récupération motrice des pattes arrières. Le modèle ne permet pas de reproduire la lésion de façon consistante et risque d'aboutir à des résultats hétérogènes et difficiles à interpréter. La seconde est l'injection intramusculaire de BMP-2. Nous avons vu plus haut que les protéines de la famille des BMP sont de puissants inducteurs de l'ostéogénèse. Dans l'étude de Engstran et coll., dont s'est inspiré l'auteur, l'injection de BMP-2 permettait à elle seule le développement de POA. De même, Kang et coll. observaient des OH chez les souris SHAM pour la contusion médullaire qui recevaient une concentration élevée de BMP-2 (0,50 µg) montrant ainsi un effet seuil à partir duquel la lésion médullaire n'est plus indispensable à la formation de OH. L'injection de BMP-2 ne permettait donc pas d'induire une lésion musculaire mais plutôt d'augmenter artificiellement le taux intramusculaire du BMP-2 permettant ainsi de déclencher les processus d'ossification, ce qui l'éloigne de la pathologie humaine.

- Un an plus tard, Genêt et coll. ont imaginé un autre modèle de souris développant des OHN [221]. Une section complète médullaire au bistouri en T11-T12 a été préférée à la contusion par lâcher de poids de façon à n'obtenir que des lésions totales de la moelle épinière. L'atteinte musculaire était provoquée par l'injection transcutanée d'une myotoxine protéique appelée cardiotoxine (CDTX) dans les muscles ischio-jambiers. Ce composé est purifiée à partir du venin du naja africain *Naja Pallida* et entraîne une lyse cellulaire des myocytes, des cellules de soutien et dans une moindre mesure, endommage les cellules de la paroi vasculaire et des nerfs périphériques cheminant au sein du muscle injecté [222]. L'injection intramusculaire avait lieu en fin de procédure chirurgicale et avant que les souris ne se réveillent de l'anesthésie.

Dans ce modèle, les souris développaient des OHN seulement si l'on associait une section chirurgicale complète de la moelle épinière entre T11-T12 et une injection intramusculaire (IM) dans les muscles ischio-jambiers (CDTX) (Figure 1) [221]. Les OHN se développaient à partir du 3^{ème} jour post-opératoire chez la souris et leur volume était quantifié par mesure scannographique entre 3 et 21 jours après la chirurgie (Figure 21 et 22).

La méthodologie pour ce modèle est plus largement détaillée dans le Chapitre 1.

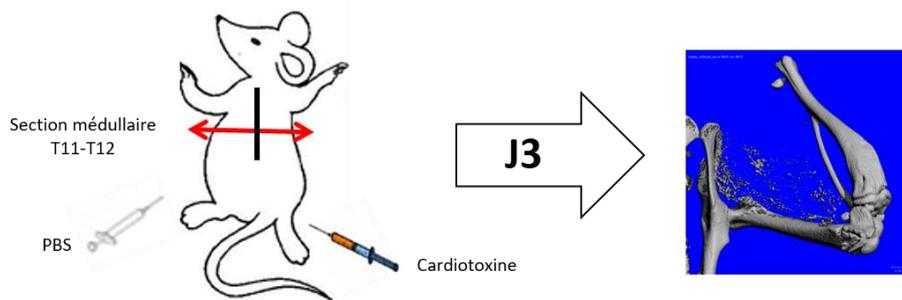


Figure 21. Modèle murin développant des OAH.

Acquisition scannographique montrant des OAH dès 3 jours après section médullaire chirurgicale en T11-T12 et injection de CDTX dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière droite et PBS dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière gauche (contrôle).

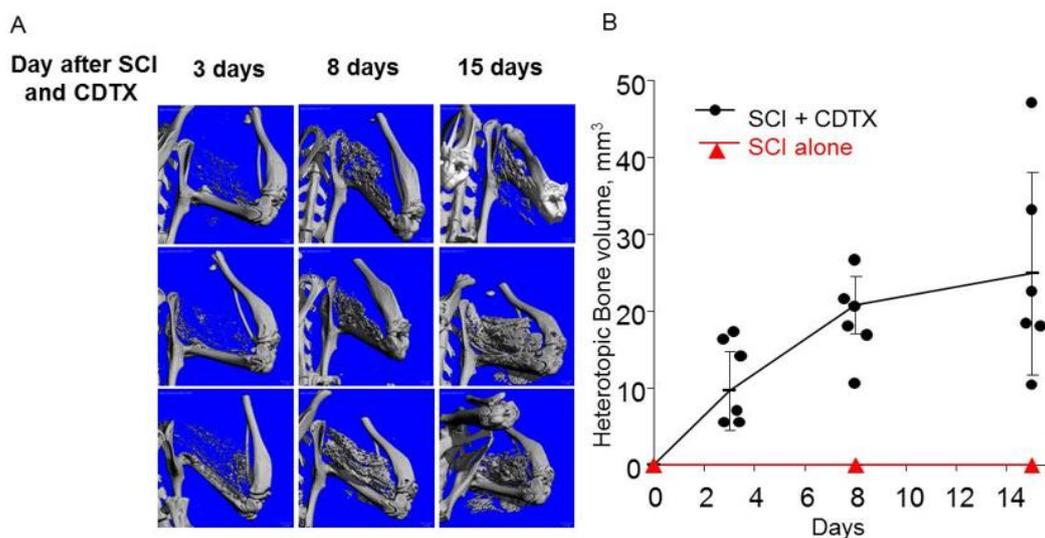


Figure 22. Cinétique d'évolution des OAH au cours du temps.

(A) Illustration de OAH de la patte arrière droite sur acquisition scannographique, à différents temps de la lésion médullaire et injection intramusculaire de CDTX. (B) Quantification du volume des OAH en fonction du temps après lésion médullaire et injection de CDTX. Chaque symbole représente une souris. Les barres représentent la moyenne \pm écart type pour chaque groupe.

Le fait que cette injection soit réalisée au travers de la peau et non pas à ciel ouvert, ne permet pas d'affirmer avec certitude que le produit est bien administré en intramusculaire. Ce geste est réalisé par une équipe entraînée mais la précision de l'injection peut expliquer, en partie, la variation de volumes des OAH observées. L'utilisation de la CDTX dans ce modèle est novatrice en permettant de créer une véritable nécrose cellulaire au sein du muscle et permet de s'affranchir de l'utilisation des BMP. Même si ce modèle semble se rapprocher de la pathologie humaine, les NHO ne sont pas localisés autour de l'articulation de la hanche mais sont présents au sein des muscles ischio-jambiers (Figure 22).

- En 2017, Shi et coll. ont préféré développer un modèle utilisant le rat [223]. Les auteurs réalisaient un traumatisme crânien par l'impaction d'un poids de 20 grammes, lâché d'une hauteur de 35 centimètres sur le lobe pariétal droit après avoir préalablement retiré une partie de la boîte crânienne.

La lésion musculaire était remplacée par une section du tendon d'Achille de la patte arrière droite, réalisée à ciel ouvert par 8 clampages successifs aux forceps, permettant une section complète du tendon. Les rats combinant lésion cérébrale et section du tendon d'Achille présentaient 100% de OHN aux contrôles radiologiques à 5 et 10 jours de la chirurgie ; alors que le groupe contrôle, n'ayant reçu que la lésion cérébrale et une simple incision en regard du tendon d'Achille (sans section tendineuse) a développé des OHN pour 40% des rats à J+5 et 60% des cas à J+10 après la chirurgie.

On peut penser que la lésion cérébrale induite, bien que reproductible anatomiquement, peut être à l'origine de symptômes plus ou moins sévères et variables d'un animal à l'autre. En effet, comme chez l'humain, les hémisphères cérébraux ont une activité asymétrique et complémentaire et ne sont pas toujours identiques selon les animaux. De plus, la contusion cérébrale induite par le lâché de poids peut entraîner des lésions plus larges et invasives par une brèche vasculaire, par exemple, qui peut entraîner un saignement intracrânien et aggraver les lésions initiales. L'œdème cérébral créé par l'impaction du poids sur le cerveau peut, également, être différent selon les rats. La lésion cérébrale par contusion paraît plus difficilement reproductible d'un animal à l'autre par comparaison avec la lésion médullaire complète par section chirurgicale. Comme pour les modèles précédents, la section du tendon d'Achille induite par clampages successif est peu probable en pathologie humaine.

Nous retiendrons de ces modèles qu'une lésion neurologique seule, sans dommage musculaire, ne suffit pas à induire de OHN. Bien qu'une lésion tissulaire (muscle et/ou tendon) soit indispensable à la constitution de OH et plus largement de OHN, les processus inducteurs de telles lésions restent artificiels chez l'animal et ne permettent pas de reproduire la localisation péri-articulaire, si caractéristique des OHN.

Plusieurs hypothèses restent encore à tester pour tenter d'expliquer l'origine et le type de lésion nécessaire à l'apparition de OHN.

2.2.3 A l'échelle cellulaire, quels sont les mécanismes en cause dans la/les lésion(s) musculaire(s) ?

a) Autres mécanismes testés

L'équipe du Pr JP Levesque (Brisbane, Australie) ont testé, à partir du modèle murin développant des OHN de Genêt et coll, des mécanismes autres que la cardiotoxine pour induire une lésion musculaire[221,224]. Les souris ont toutes eu une section médullaire complète chirurgicale entre T11 et T12. La méthodologie pour ce modèle est plus largement détaillée dans le Chapitre 1.

Une première expérience a consisté à injecter dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière droite, des lipopolysaccharides (LPS) à une concentration de 2,5mg/kg provenant d'*Escherichia coli* 0111:B4. Ce produit issu de la membrane bactérienne d'*Escherichia coli*, est un puissant inducteur de l'inflammation. Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'inflammation semble être particulièrement présente chez les patients développant des POA et POAN. L'hypothèse ici, était donc de déclencher le

processus conduisant à la formation de OHN en augmentant l'inflammation locale au sein du muscle, immédiatement après une lésion du SCN. La patte arrière gauche servait de contrôle et était injectée de Phosphate-Buffered Saline (PBS). A 10 jours de la chirurgie, l'évaluation radiologique ne visualisait aucune OHN que ce soit dans la patte injectée de LPS ou dans la patte ayant reçu du PBS.

Dans une seconde expérience, l'injection intramusculaire était remplacée par un écrasement des muscles ischio-jambiers qui se rapproche d'avantage d'un polytraumatisme que pourrait causer un accident chez l'être humain. Un poids de 132 kg était lâché sur les muscles ischio-jambiers mis à nus, d'une hauteur de 15 cm pour un groupe de souris (Impact 1) (énergie de l'impact : 0,19 Joules) et 25 cm (Impact 2) (énergie de l'impact : 0.32 Joules) pour un autre groupe. Une fois de plus, aucune OHN n'a été détectée lors de l'acquisition scannographique à 10 jours de la chirurgie.

Devant l'absence d'OHN visibles avec les 2 mécanismes précédents, une troisième expérience a additionné l'injection de LPS et l'écrasement musculaire afin de se rapprocher un peu plus de la pathologie clinique combinant régulièrement atteinte du SNC, traumatisme périphérique et infection systémique. Une injection de LPS 2,5mg/kg était réalisée dans les muscles ischio-jambiers, immédiatement après l'écrasement musculaire à 15 cm (Impact 1) et 25 cm de hauteur (Impact 2). L'association de ces 2 mécanismes permettaient de former des OHN ce qui n'était pas le cas dans les groupes avec écrasement musculaire seul ou avec injection de LPS isolée (Figure 22). De plus, les OHN étaient plus volumineux lorsque l'écrasement musculaire avait lieu d'une hauteur de 25 cm plutôt qu'une hauteur de 15 cm, tout en étant couplé à une injection intramusculaire de LPS 2,5mg/kg (Figure 23). On peut observer que le volume des OHN reste faible comparativement aux volumes obtenus après injection de CDTX seule (Figure 22).

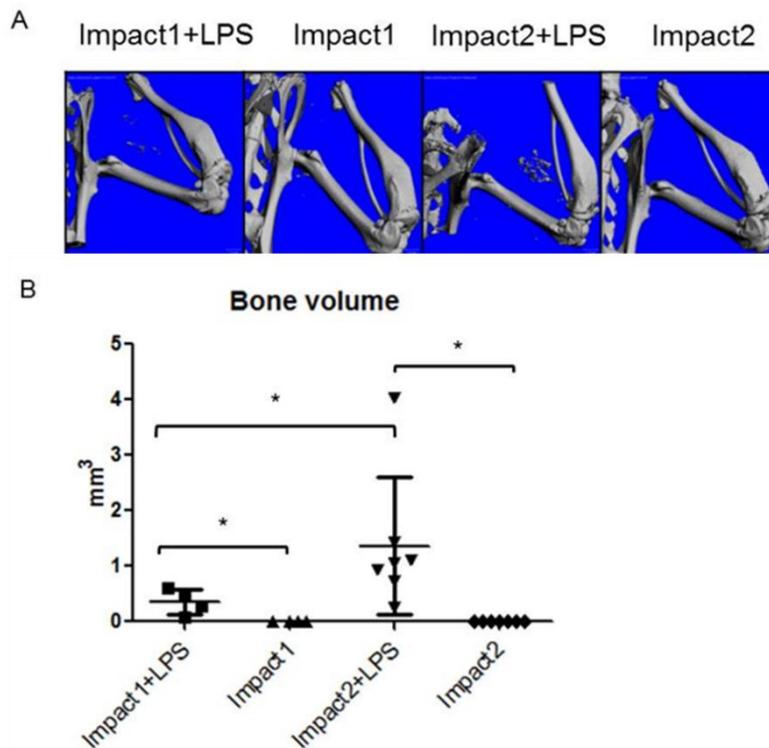


Figure 23. Volumes des OHN à 10 jours Impact 1 et Impact 2 +/- injection de LPS.

(A) Images de scanners réalisés 10 jours après lésion médullaire et écrasement musculaire d'une hauteur de 15 cm (Impact 1) ou 25 cm (Impact 2) +/- injection intramusculaire de LPS ; (B) Volumes des OHN à 10 jours de la chirurgie, $p < 0.05^*$. Chaque symbole représente une souris. Les barres représentent la moyenne \pm écart type pour chaque groupe.

Au terme de ces observations, il semble que la nécrose cellulaire, induite par la CDTX dans le modèle de Genêt et coll., soit indispensable à la formation de OHN, dans un contexte de lésion médullaire. Cependant, en pratique clinique, les patients ne reçoivent pas d'injection intramusculaire de CDTX pendant leur accident. De même, tous les patients ne sont pas victime d'un polytraumatisme avec fracture, luxation ou hématomes, c'est le cas des patients victime d'un AVC, par exemple. Nous avons alors pensé à d'autres hypothèses pouvant occasionner une nécrose musculaire : contexte septique (sepsis et choc septique) et immobilité musculaire.

b) Autres hypothèses non testées

- Nous avons vu dans la première partie de cette thèse que les patients à risque de développer des POAN et POA sont sujets aux hospitalisations en réanimation et aux infections bactériennes (urinaires et pulmonaires). La présence d'un sepsis ou bien d'un choc septique sont tous deux des motifs d'hospitalisation ou de maintien en réanimation et présentent comme point commun, une infection initiale, le plus souvent bactérienne. Depuis 2016, le sepsis est défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection [225]. Le choc septique correspond à un sous-groupe du sepsis et caractérisé par la présence d'anomalies importantes circulatoires et métaboliques [226]. La mortalité hospitalière du sepsis est estimée à 10%, alors que celle du choc septique est d'environ 40% [225,226]. Les patients survivant à ces épisodes de sepsis et choc septique présentent une perte musculaire généralisée. A la phase précoce d'un sepsis, le

catabolisme musculaire peut être bénéfique car il procure de la glutamine au système immunitaire, entretient la glycogénèse et la synthèse des protéines dans le foie par la libération d'acides aminés [227,228]. Cependant, lorsque le sepsis s'installe dans le temps, l'activité catabolique persiste entraînant une dégradation musculaire [229] avec perte de protéines des cellules différenciées (myofibrilles) mais aussi indifférenciées (cellules progénitrices musculaires, notamment cellules satellites) [230,231]. Il en découle une atrophie et une faiblesse musculaire qui peuvent avoir des conséquences clinique persistant jusqu'à 5 ans après le sepsis initial [232,233].

Les infections et hospitalisations en réanimation ont largement été rapportées comme étant corrélées à la survenue de POA et POAN par les études cliniques (cf partie I). Même si les sepsis et chocs septiques n'ont pas été directement décrits comme des facteurs de risque des POAN, ils pourraient expliquer en partie, la dégradation musculaire responsable du développement ultérieur de POAN. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse par l'induction d'un sepsis chez des souris avec lésion médullaire, mais sans injection de CDTX, pour voir si l'inflammation et la nécrose induites par un tel sepsis sont suffisantes à l'apparition de POAN.

- Une lésion des tissus musculaires et conjonctifs péri-articulaires pourrait également être provoquée par la remobilisation des tissus suivant une période d'immobilité, chez les patients admis pour soins aigus. Ce point a été évoqué dans le paragraphe concernant la mobilisation articulaire en prophylaxie primaire de l'apparition de POAN (voir section II). Il est commun à l'ensemble des patients développant des POA et POAN. En effet, que ce soit suite à une atteinte aiguë du SNC, une admission en réanimation, une amputation traumatique ou encore une brûlure grave, les patients sont généralement au repos strict, installés dans un lit en décubitus dorsal. Ils restent, sauf exception, dans cette position jusqu'à ce que l'amélioration clinique permette d'initier une mobilisation passive des amplitudes articulaires par le kinésithérapeute. Le terme immobilité a, d'ailleurs, été préféré à celui d'immobilisation car les patients, en dehors de fractures, ne nécessitent pas d'être contraints à l'immobilisation, il s'agit plutôt d'une conséquence. De plus, on distingue immobilité et paralysie. Comme nous le verrons plus bas, certains patients développent des POAN en zone non déficitaire, faisant penser qu'il existe des facteurs systémiques expliquant de telles localisations.

Michelsson est le premier à s'être intéressé à ce phénomène. Il a utilisé un modèle non neurologique de lapin développant des OH au niveau de la patte arrière, ayant bénéficié d'une prise en charge alternant immobilisation sous plâtre et mobilisation articulaire intense (300 mouvements/jour). Ses travaux concluaient que la formation de OH était la conséquence d'une distension musculaire forcée et répétée sur des tissus préalablement immobilisés [86]. Izumi et coll. ont appliqué le protocole de Michelsson à l'identique sur des rats spinalisés. Les résultats étaient exactement superposables à ceux de Michelsson, que les rats soient spinalisés ou non, apportant la notion que la mobilisation devait être intense (vs. douce) pour engendrer la formation d'une OH [87]. Dans ce dernier modèle, Izumi et coll. soulignaient que la lésion médullaire, contrairement à leur prévision, ne permettait pas d'augmenter le

nombre d'animaux développant des OH ni d'augmenter leur volume, une simple mobilisation intense des tissus préalablement immobilisés était suffisante. Cependant, l'analyse histologique différait selon que les animaux avaient été spinalisés ou non. Les rats avec section médullaire présentaient des OH issues d'une ossification endochondrale, alors que les rats sans la section médullaire, avaient développé des OH via un processus d'ossification intramembranaire.

Au regard de ces observations, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle si le(s) muscle(s) paralysé(s) dans les suites d'une lésion neurologique centrale n'est/ne sont pas mobilisé(s) dès l'arrivée du patient en milieu hospitalier. Les tissus péri-articulaires (capsule, tendons, muscles, fascia) subissent alors des changements architecturaux et moléculaires irréversibles. Lorsque le membre est à nouveau mobilisé passivement, ces mêmes tissus font l'objet de lésions entraînant inflammation et nécrose qui déclencheront la formation de POAN via un processus de régénération cellulaire anormal. Les résultats précliniques permettent également de suggérer que la survenue de POAN et l'ossification endochondrale sont favorisées par la lésion neurologique centrale. Ces hypothèses feront prochainement l'objet d'un projet collaboratif de recherche transversale.

2.3 Inflammation locale

2.3.1 Bone Morphogenic proteins

Ces 10 dernières années ont été marquées par l'identification des BMP comme des acteurs importants de la régulation de l'ostéogénèse [234,235]. Des progrès ont été faits dans la compréhension des voies de signalisation du BMP dans les ossifications hétérotopiques, notamment au travers de la multiplication de modèles animaux visant à explorer les OH acquises [235]. Ces modèles hyperexpriment généralement la voie de signalisation du BMP par l'utilisation d'implants d'hydrogel ou des matrices en polymère disposées dans le muscle, par l'injection intramusculaire de BMP, ou encore par l'administration d'un système permettant la transduction cellulaire des voies du BMP [18]. L'augmentation des concentrations locales de BMP permet à elle seule, l'apparition d'ossifications ectopiques [18].

La voie de signalisation du BMP a été plus rarement étudiée dans le cadre des OHN. Seuls Kang et coll. ont utilisé le BMP-2, à faible concentration, dans un modèle murin, permettant d'induire le développement de OHN [218]. Ils ont montré une augmentation intramusculaire de plusieurs des protéines de la famille du BMP après contusion médullaire isolée (sans injection combinée de BMP): BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-9 [218]. En revanche, l'expression des récepteurs du BMP 1 et 2 reste similaire au groupe SHAM pour la lésion médullaire.

Dans le modèle de Genêt et coll., Kulia et coll. ont mis en évidence une importante augmentation des BMP-2, BMP-4 et BMP-7 dans le muscle prélevé chez des souris à 2 jours de la lésion médullaire.

Les protéines du BMP semblent donc participer à la formation d'OHN mais les preuves ne sont pas

suffisantes aujourd'hui pour l'affirmer.

Les BMP sont principalement sécrétées par les cellules stromales de l'environnement tissulaire mais aussi par les macrophages [18].

2.3.2 Hypoxia inducible factor alpha

L'hypoxie et la nécrose cellulaire du tissu musculaire ont préalablement été évoquées comme des piliers dans la survenue de POAN [221,224]. Pendant l'ostéogénèse, la réponse à l'hypoxie est régulée par l'Hypoxia Inducible Factor alpha (HIF-1 α), un facteur de transcription. Récemment, un grand nombre d'études utilisant des modèles génétiques et acquis d'ossifications hétérotopiques ont indiqué qu'une augmentation du taux de HIF-1 α pourrait participer à leur formation [236,237]. Lorsque le niveau d'oxygène devient insuffisant, HIF-1 α est hydroxylé et devient une cible à détruire [238,239]. Pour cette hydroxylation, HIF-1 α a besoin de fer et d'oxygène qui sont absents en cas d'hypoxie [238,239]. De ce fait, on assiste à une accumulation rapide de HIF-1 α qui atteint le noyau où il augmente l'expression de Vascular endothelial growth factor alpha (VEGF α), le principal régulateur de l'angiogénèse [239]. Angiogénèse et ostéogénèse sont fortement intriquées lors du développement des os et de la réparation fracturaire. HIF-1 α est alors nécessaire au maintien et à la différenciation des préchondrocytes pendant l'ossification endochondrale [238].

A la phase précoce suivant une atteinte médullaire traumatique, HIF-1 α a été retrouvé dans les lésions inflammatoires médullaires et périphériques [65]. C'est également ce qui a été observé dans un modèle animal de FOP par Wang et coll. [236]. Bien que le modèle d'ossification hétérotopique reproduise une maladie génétique, le type d'ossification endochondrale est commune avec les OHN et les POAN. Dans cette étude, les auteurs constataient que l'hypoxie au sein des lésions inflammatoires était particulièrement importante et que HIF-1 α augmentait l'intensité et la durée de la liaison entre les BMP et leur récepteur. Le blocage de HIF-1 α par un antagoniste, permettait de rétablir une liaison physiologique entre BMP et récepteur. Les auteurs constataient aussi une réduction considérable de la taille des ossifications hétérotopiques [236].

D'autres équipes ont également observé la réduction d'os ectopique dans des modèles de OH acquises [237,240,241]. Dans un modèle de ténotomie, Zimmermann et coll. inhibaient HIF-1 α par l'utilisation d'un antibiotique, l'échinomycine qui bloque la fixation de l'ADN au facteur HIF-1 α [241]. Son utilisation réduisait de façon significative le volume des OH. D'autres inhibiteurs de HIF-1 α ont été testés, le PX-478, un traitement anti-cancéreux et la rapamycine, de la classe des immunosuppresseurs, avec les mêmes résultats sur le volume des OH que l'échinomycine [237]. A l'issue de ces observations, les auteurs suggéraient que l'inflammation et l'hypoxie provoquaient, via HIF-1 α , une activation exagérée du gène *ACRV1*, ce qui expliquait l'amplification de la voie de signalisation du BMP conduisant à la formation d'OH [237].

L'effet du blocage de HIF-1 α n'a toutefois jamais été testé dans un modèle de souris développant des

OHN. Le partage de la même voie d'ossification endochondrale avec la FOP, fait penser que les résultats seraient très probablement similaires. Cependant, l'importance de l'angiogénèse suivant une lésion aiguë du SNC amène à reconsidérer l'utilisation d'inhibiteurs de HIF-1 α qui pourraient aggraver les lésions initiales et compromettre la récupération neurologique.

2.3.3 Récepteur nucléaire de l'Acide Rétinoïque

La voie de signalisation de l'acide rétinoïque régule la croissance et le développement du squelette [242]. Pour engager l'ossification endochondrale, le taux d'acide rétinoïque doit baisser car une activation continue des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) diminue la chondrogénèse et la différenciation des précurseurs chondrocytaires [243]. Il existe plusieurs sous-unités pour ces récepteurs dont les RAR α et les RAR γ .

La chondrogénèse étant le pivot de l'ossification endochondrale conduisant aux ossifications hétérotopiques dont les POA, l'activation des RAR a fait l'objet de plusieurs études cherchant à prévenir l'apparition de ces formations ectopiques [244–246]. Shimono et coll. ont montré que les ossifications ectopiques créées par l'implantation d'un matrigel imprégné de BMP-2 dans la partie ventrale de l'abdomen d'une souris, voyaient leur volume se réduire après administration d'un agoniste des RAR α , le NRX19518 [246]. Une analyse par microarray des gènes des OH, a révélé une réduction de l'expression de gènes clefs dans la formation d'OH dont le VEGF α , certains gènes impliqués dans la chondrogénèse (Sox9, collagène 10 et 11) et d'autres impliqués dans l'ostéogénèse (famille des BMP et Runx2) [246]. Ces résultats suggèrent qu'un traitement par agoniste des RAR α pourrait réduire la taille des OH par l'inhibition de la formation de cartilage et de l'angiogénèse.

D'autres études récentes indiquaient que l'activation des RAR γ aurait également un effet anti-OH [245,247]. Dans un autre modèle animal développé par Shimono et coll., la combinaison d'un traumatisme local et de l'implantation d'une éponge collagénique imbibée de BMP-2 dans le triceps sural, résultait en la formation de larges ossifications ectopiques. Un traitement par agoniste des RAR γ permettait de prévenir leur apparition [246]. Pavey et coll. ont récemment examiné l'effet d'un agoniste des RAR γ , le palovarotène sur un modèle de rat développant des OH [245]. Ce modèle de polytraumatisme cherchant à reproduire les blessures des soldats avec amputations traumatiques, consistait en l'association de blessure par blast, fracture fémorale, compression musculaire du quadriceps conduisant à l'amputation du membre dans la zone traumatisée et inoculation de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline [245]. L'analyse des gènes présents au sein du muscle de l'extrémité du moignon après administration de palovarotène retrouvait une réduction de l'expression de gènes importants dans la chondrogénèse (Sox9 and collagen2 α 1) et dans l'ostéogénèse (ostéocalcine, BMP-2, BMP-4 et Runx2). De plus, le traitement permettait de réduire le volume des POA formées sur le site de l'amputation lorsqu'il était commencé entre 1 et 5 jours suivant le traumatisme.

Les études explorant l'activation des RAR γ ont proposé l'hypothèse selon laquelle les agonistes des RAR γ agiraient en réduisant le signal des BMP. Ce qui aboutirait à l'inhibition de la différenciation des

chondrocytes et donc la chondrogénèse conduisant à réduire l'apparition d'ossifications ectopiques. Ce traitement paraît prometteur devant le fort potentiel anti-ostéogénique et anti-chondrogénique retrouvé dans les études précliniques. Il fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 2 dans la FOP. Les premiers résultats montrent une diminution significative du nombre et de la taille des ossifications ectopiques chez les patients FOP traités par comparaison au groupe contrôle (<http://clementiapharma.com/phase-2-part-open-label-extension-trialpalovarotene-treatment-patients-fibrodysplasia-ossificans-progressivacontinues-positive-trends/>). L'efficacité du traitement chez les patients à risque de développer des POA acquises n'a pas encore été étudiée mais devrait faire l'objet d'études à venir.

2.3.4 Neuroinflammation

La neuroinflammation est présente à l'échelle locale mais aussi systémique.

L'équipe de Salisbury et coll. s'est beaucoup intéressée aux mécanismes inflammatoires médiés par le système nerveux périphérique dans des modèles d'ossifications hétérotopiques induites par l'administration de BMP-2 [248]. L'expression de BMP-2 intramusculaire, chez la souris, permettait la formation d'os ectopique endochondral à 7 jours de l'injection. Les auteurs ont montré que le BMP-2 présent localement dans le muscle, stimulait des nerfs sensitifs via les récepteurs à la capsaïcine (TRPV1) permettant ainsi, le relargage de substance P (SP) et de calcitonin gene related peptide (CGRP). Ces molécules entraînaient le recrutement de mastocytes et leur dégranulation. Les agents ainsi relargués (rérotonine, tryptase et chymase) permettaient l'activation et la différenciation cellulaire en ostéoblastes [248]. Cette expérience, reproduite à l'identique chez des souris dépourvues de neurones sensitifs (TRPV1-/-), permettait une diminution majeure des OH. De même, lorsque la dégranulation des mastocytes était inhibée par l'administration de cromolyn, la taille des OH était significativement réduite.

Le rôle du système nerveux périphérique a spécifiquement été étudié dans le modèle de Genêt et coll. Une première étude a consisté à sectionner les nerfs crural et ischiatique de la patte arrière droite, également injectée par de la CDTX dans les suites d'une BM [249]. La patte controlatérale, servait de contrôle et était injectée de CDTX seule. Contrairement à ce qui était attendu, les auteurs observaient une augmentation significative du volume des OHN dans la patte arrière dénervée après section du nerf crural et ischiatique ($p=0,03$). En effet, l'hypothèse en sectionnant les nerfs périphériques, était d'obtenir une diminution de la neuro-inflammation locale via la sécrétion de substance P et donc une réduction du volume des OHN. De façon tout aussi surprenante, 1 souris sur 2, du groupe SHAM pour la BM mais ayant reçu de la CDTX associé à une dénervation périphérique par section des nerfs crural et ischiatique de la patte arrière droite, a développé des OH (NS) [249]. Une seconde expérience bloquant la jonction neuromusculaire par des injections de toxine botulique, retrouvait des résultats

superposables (voir chapitre 2) [249].

Ma et coll. rapportaient une augmentation de l'expression du BMP-2 après lésion du nerf ischiatique qui contribuerait à la régénération axonale des neurones sensitifs [250]. Cette observation permet de relier les résultats de Salisbury à ceux de Debaud et Salga et pourrait expliquer l'apparition de OH dans le modèle d'OHN avec dénervation périphérique.

L'altération de la barrière hémato-neuronale a également été évoquée pour expliquer l'apparition de POAN. Une fois la cascade de neuroinflammation activée, se produit une migration de cellules périneurales et épineurales provenant du nerf périphérique endommagé. Les cellules de la région périneurale modulent l'expression et l'activation de la matrix metallopeptidase 9 (MMP9), une protéine essentielle dans la régulation de l'ouverture de cette barrière [251]. La BMP-2 serait capable, chez la souris, de passer cette barrière très rapidement après lésion, afin d'activer des cellules spécifiques de l'épinèvre.

Les résultats suggèrent donc une implication majeure du SNP dans la modulation du signal conduisant à la formation de POAN. Toutefois, d'autres études sont nécessaires de façon à préciser les mécanismes de neuro-inflammation.

2.4 Lésion aigüe du SNC

Les POAN peuvent être diagnostiquées suite à différentes atteintes du SNC. Dans tous les cas, la lésion survient de façon aigüe et subite ce qui va engendrer un grand nombre de modifications organiques et fonctionnelles.

2.4.1 Dérégulation du système nerveux autonome (SNA)

Dans la section concernant les facteurs de risques cliniques identifiés dans la survenue de POAN, nous avons vu que les crises neuro-végétatives chez les patients traumatisés crâniens tout comme les lésions médullaires hautes (cervicale ou thoracique) sont en lien avec une dysfonction du SNA.

Les centres végétatifs s'étendent du cerveau (hypothalamus) à la moelle épinière, en passant par le tronc cérébral. Les centres orthosympathiques se situent dans la moelle thoracique entre T3 et T13. Ils influencent le système immunitaire via les ganglions post-synaptiques qui se projettent sur la rate et les fonctions endocriniennes (glandes surrénales). Les symptômes vont donc dépendre du niveau de l'atteinte neurologique [252].

Le rôle du SNA est difficile à étudier, même en recherche fondamentale sur des modèles animaux, car il assure le fonctionnement des fonctions vitales et toute manipulation peut entraîner un état critique. Toutefois, sa participation dans l'ostéogénèse des POAN est fort possible par son innervation double du système endocrinien et immunitaire tous deux impliqués dans le métabolisme osseux [253]. Ils sont chacun traités dans les paragraphes suivants.

2.4.2 Dérégulation endocrinienne

Il est déjà établi qu'une atteinte du SNC, notamment suite à un TC peut occasionner un dérèglement de l'axe hypothalamo-hypophysaire [254,255]. Les études suggèrent que les patients avec un TC léger ou modéré sont plus à même de récupérer leur fonction pituitaire au cours du temps que les patients TC graves qui peuvent garder des dysfonctions endocriniennes chroniques sévères [254].

Des dérèglements endocriniens peuvent aussi survenir après atteinte médullaire. Il a été rapporté que les patients avec BM gardent un taux de cortisol urinaire élevé plusieurs mois suivant l'accident, suggérant une dysfonction prolongée de l'axe hypothalamo-hypophysaire [256]. Le cortisol est essentiel à l'ostéogénèse, mais un taux élevé sur le long terme augmente la résorption et réduit la formation osseuse conduisant ainsi à une fragilisation de la structure osseuse [253].

Lucin et coll. retrouvaient chez des souris spinalisées en T9 (au sein des centres médullaires sympathiques) et en T3 (au-dessus des centres médullaires sympathiques) des taux sanguins similaires mais toujours plus élevés chez les souris avec BM que dans le groupe contrôle. Les résultats étaient identiques qu'il s'agisse d'une contusion ou d'une section de la moelle épinière et montraient un dérèglement de l'axe corticotrope quel que soit le niveau et la gravité de la BM [257].

Une autre étude précisait l'action du cortisol sur l'os. Il modulerait l'action de certaines cytokines inflammatoires (interleukine-1 alpha) qui dans un second temps agiraient sur la formation, et la résorption osseuse ainsi que la production de prostaglandines [258].

2.4.3 Dérégulation du système immunitaire

Les lésions du SNC déclenchent l'activation de système immunitaire inné mais aussi acquis. Les patients sont particulièrement à risque de développer des infections après atteinte neurologique centrale. Ce phénomène est principalement attribué à la lésion neurologique et peut être aggravé par d'autres facteurs iatrogéniques, métaboliques mais aussi par la sédentarité [252].

De nombreuses cytokines inflammatoires telles que la C-reactive protein (CRP), IL-6, colony stimulating factors (CSF), Parathyroïde Hormone (PTH), PAL et TNF- α sont sécrétées par les cellules de l'immunité innée et sont présentes dans la circulation sanguine dès la première heure suivant la lésion aigüe du SNC [81]. Ce phénomène contribue à la cicatrisation des tissus endommagés. Il a également été montré que ces mêmes cytokines inflammatoires participent à la différenciation de cellules progénitrices en cellules osseuses conduisant à la formation de POAN [176].

Le système immunitaire acquis est également affecté par les atteintes du SNC [252,257]. Lucin et coll. ont montré que des souris spinalisées en T9 avaient un taux d'anticorps circulants et de noradrénaline dans la rate identique aux souris contrôles. Dans le groupe spinalisé en T3, les auteurs observaient une diminution de la synthèse d'anticorps et du taux de noradrénaline au sein de la rate. Ils expliquaient que l'immunosuppression était la conséquence de l'action de la noradrénaline sur les récepteurs β 2-

adrénergiques. De façon assez surprenante, on assistait à une réversibilité de l'immunosuppression par l'utilisation d'un antagoniste aux récepteurs β 2-adrénergiques [257].

Ces résultats montrent l'effet niveau dépendant de la lésion neurologique centrale sur l'immunosuppression dont les effets sont médiés par le SNA.

2.4.4 Potentiel ostéogénique

Plusieurs études cliniques ont prouvé qu'il existe un facteur humoral responsable d'une accélération de la cicatrisation des fractures osseuses et une augmentation de l'ostéogénèse après TC et BM pouvant expliquer la survenue de POAN [217,259].

Cadosh et coll. a comparé le potentiel ostéoinducteur de sérum provenant de 3 populations de patients : 1) traumatisés crâniens sévères, 2) avec fractures de membre et 3) sains [260]. Les sérums étaient mis en cultures avec des cellules progénitrices musculaires pendant 3 semaines. A la lecture des résultats, ils ont constaté que le sérum provenant des patients TC avait augmenté de façon significative la prolifération des cellules progénitrices musculaires et leur différenciation ostéoblastique, comparativement au groupe de patients avec fractures et au groupe de sujets sains. Ils concluaient que le TC permettait le relargage de substances ostéoinductrices dans la circulation générale stimulant la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices musculaires en cellules osseuses.

Gautschi et coll. ont même suggéré l'existence d'un effet ostéoinducteur dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) chez les patients après TC [261]. Dans cette étude, les auteurs comparaient le pouvoir ostéoinducteur du LCR prélevé chez des patients TC avec d'autres patients victimes d'une pathologie cérébrales non traumatiques et des sujets sains. Ils ont pu mettre en évidence la prolifération et la différenciation de précurseurs musculaires plus importante chez les patients TC, confirmant les effets du LCR sur la stimulation ostéogénique *in vivo*. Cependant, le taux des protéines dosées (BMP-2, BMP-4, BMP-7) était similaire entre les différents groupes.

Des équipes de recherche fondamentale se sont intéressées au pouvoir ostéoinducteur des protéines de la famille du BMP. Ils montraient une augmentation intramusculaire de plusieurs protéines suite à une lésion de la moelle épinière : BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-9 [218,224]. Ces résultats appuient le rôle de la lésion neurologique dans la libération de facteurs ostéogéniques pouvant expliquer l'apparition de POAN.

Comme évoqué plus haut, les BMP ont une action de réparation des astrocytes dans le SNC en cas de lésion [204]. Il est possible qu'il y est une diffusion systémique des protéines BMP en cas de lésion neurologique par rupture de la barrière hémato-méningée.

2.5 Facteurs systémiques

2.5.1 Attestation de la présence de facteurs systémiques

Des facteurs systémiques sont relargués dans la circulation sanguine après section médullaire et injection de CDTX [221]. Deux expériences ont permis d'arriver à cette conclusion.

Dans son modèle, Kang et coll. avaient injecté une dose de 0,25 µg de BMP-2 dans le triceps de la patte avant droite, en zone sus-lésionnelle, dans les suites d'une contusion médullaire [218]. Quinze jours après la chirurgie, l'analyse scannographique retrouvait des OHN chez 75% des souris ayant reçu BMP-2 et contusion médullaire. Aucune des souris contrôle (SHAM pour la lésion médullaire) n'avait développé d'OH.

Une expérience du même type a été menée sur le modèle de Genêt et coll. Elle a consisté à injecter la CDTX dans la patte avant droite et du PBS dans la patte avant gauche (contrôle), en zone sus-lésionnelle et donc non paralysée. Des POAN se sont développées dans les muscles injectés de CDTX dans la patte avant droite, 8 jours après la chirurgie alors qu'aucune POAN n'était visible dans la patte contrôle. Dans la seconde expérience, du sang circulant de souris était recueilli 4 jours après BM et injection de CDTX. Il était ensuite mis en culture avec des cellules progénitrices musculaires issues de souris naïves. Après 2 semaines de culture, une minéralisation a pu être observée uniquement dans le groupe BM+CDTX, confirmant la présence de facteurs systémiques circulant [221]. Par la suite, des travaux ont été menés dans le but d'identifier ces facteurs inflammatoires systémiques selon deux hypothèses, la première empruntant la circulation sanguine et la seconde, cheminant via le système nerveux périphérique.

2.5.2 Facteurs inflammatoires libérés dans la circulation systémique

a) Oncostatine M

L'oncostatine M (OSM) est connue pour être une protéine inflammatoire dotée d'un fort pouvoir ostéogénique [262,263]. Une expérience a consisté à appliquer le modèle murin de Genêt et coll. à des souris « knock-out » (KO) pour le gène du récepteur de l'OSM (*Osmr*^{-/-}). Sept jours après la chirurgie, le groupe KO pour le gène *Osmr* présentait des OHN 3 fois plus petites que les souris contrôles sauvages (C57BL/6) ($p < 0,05$) [3]. De plus, dans le muscle ischio-jambier injecté avec de la cardiotoxine, l'OSM s'accumulait autour des OHN chez les souris ayant subi une BM alors qu'il y avait une régénération musculaire normale sans OHN et sans accumulation d'OSM dans les ischio-jambiers injectés avec de la cardiotoxine sans BM [3]. Ce résultat est en faveur d'une participation de l'OSM dans la formation de OHN.

Chez l'humain, cette cytokine a été dosée dans le sang de patients avec POAN, à des taux anormalement élevés en comparaison avec la population générale saine. Ces dosages étaient effectués en pré-opératoire de l'exérèse chirurgicale des POAN, à des temps variables suivant la lésion du SNC et d'évolution des POAN. L'OSM a également été retrouvée en grande concentration, localement, sur le site de développement de POAN, lors de l'analyse histologique des pièces opératoires [3].

Une expérience in vitro a mis en évidence que la sécrétion locale d'OSM est assurée par les macrophages activés, favorisant ainsi la différenciation des cellules progénitrices musculaires en cellules ostéogéniques et la minéralisation du tissu adjacent [3].

Récemment, le modèle murin a servi à l'exploration de la voie de signalisation de l'OSM [264]. Tout d'abord, il a été montré que la BM était à l'origine d'une augmentation de l'infiltration de monocytes et de macrophages inflammatoires au sein du muscle endommagé par l'injection de CDTX et que ces cellules produisaient de l'OSM. In Vitro, la liaison de l'OSM à son récepteur OSMR présent sur les cellules progénitrices musculaires (cellules satellites et interstitielles), déclenchait l'activation de la tyrosine kinase JAK1/2, à l'origine de la phosphorylation et activation du facteur de transcription STAT3. Il a été montré qu'une BM associée à une lésion musculaire entraînait une augmentation et une persistance prolongée de la phosphorylation de STAT3 dans le muscle endommagé. Cette augmentation persistait jusqu'à 2 semaines, uniquement dans le muscle où se forme les OHN. Dans le modèle murin développant des POAN, l'inhibition de JAK1/2 par l'inhibiteur de tyrosine kinase spécifique, ruxolitinib, a permis de diminuer la phosphorylation de STAT3 dans les muscles endommagés par de la CDTX mais ainsi de réduire le volume des OHN [264]. Cette voie de signalisation apparaît comme une cible thérapeutique intéressante et fait l'objet des nouveaux travaux. Cependant son utilisation pourrait être limitée par le fait que le ruxolutinib peut induire anémie et thrombopénie [265].

b) Matrixmetalloproteinase

Le taux sanguin de matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) est augmenté après TC et BM [266,267], alors qu'il a été montré que l'inhibition de MMP-9 améliore les aspects neurocomportementaux après TC et la fonction locomotrice après BM [268,269].

Rodenberg et coll. ont suggéré que la MMP-9 pourrait être un biomarqueur permettant de détecter la survenue d'OH à un stade précoce de leur formation par son rôle sur la réorganisation de la matrice extracellulaire [270]. Cependant, dans ce modèle murin d'OH induit par BMP-2, l'augmentation du taux de MMP-9 était détectée dans le muscle où se formait les OH par une méthode de tomographie par émission de positons. Les auteurs n'ont pas mesuré les concentrations sanguines de MMP-9 chez les souris avec versus sans OH.

D'autres auteurs ont également proposé les MMP-9 comme potentiels biomarqueurs des POAN devant leur implication dans la chondrogénèse et l'angiogénèse, indispensables à l'ossification endochondrale [271].

c) Interleukines

Des études récentes ont montré que l'élévation des concentrations sériques de certaines cytokines inflammatoires chez les soldats blessés au combat étaient corrélées au développement de POA [272,273]. Dans cette population de patients, Evans et coll. rapportaient une élévation du taux d'IL-10, IL-6 et MCP-1 comme des cytokines aidant au diagnostic de POA [272]. Ces trois cytokines ont été

précédemment identifiées comme étant impliquées dans le métabolisme osseux [274–276]. L'IL-6 stimule l'ostéoclastogénèse de par son mécanisme d'ostéorésorption mais elle joue aussi un rôle important dans la différenciation ostéoblastique et la stimulation de la formation osseuse [274]. C'est pourquoi, l'IL-6 circulante pourrait être un marqueur du développement des POA et par extension, des POAN.

Forsberg et coll. ont suggéré une corrélation entre POA et augmentation du taux sérique d'IL-3 et réduction de l'IL-12p70 [273]. L'IL-3 est connue pour être un stimulateur de la différenciation des cellules mastocytaires qui, comme nous l'avons vu plus haut, contribue à la formation de POA [248]. La relation entre l'IL-12p70 et POAN reste peu claire, cependant, cette cytokine pourrait être une nouvelle piste dans les mécanismes physiopathologiques conduisant au développement de POAN.

Il est important de noter que les études de Evans et Forsberg ont été réalisées chez des blessés militaires. Les lésions multiples et hétérogènes peuvent être source de facteurs confondants dans l'augmentation du taux sériques des cytokines inflammatoires suscitées et remettre en question leur rôle dans la survenue de POA. Malgré ces limitations, les résultats de ces études sont importants car ils peuvent être utilisés pour établir un seuil de sévérité à partir duquel, les patients deviennent plus susceptibles à la survenue de POA.

L'identification de biomarqueurs semble importante pour préciser plus finement et de façon précoce les patients à risque de développer des POA. C'est ce que nous mettons en place au travers de l'étude BENTHOS avec la constitution d'une banque de tissus biologiques qui permettra de rechercher dans le sang, l'urine et le liquide céphalorachidien, de molécules d'intérêt identifiées comme participant à l'élaboration de POAN d'après les études menées dans le modèle animal de Genêt et coll. (voir chapitre 5).

2.5.3 Facteurs inflammatoires systémiques cheminant via le SNP : la substance P

La substance P est un neuropeptide, qui entre autre, transmet la réponse physiologique à la douleur depuis les récepteurs connectés au système nerveux périphérique jusqu'à la corne postérieure de la moelle épinière. Il est produit par les neurones mais aussi les ostéoblastes et les macrophages. La substance P a été rapportée comme participant au mécanisme de neuro-inflammation, en favorisant la formation des OH dans les modèles génétiques de FOP et les OH acquises [248,277].

Pour tester le rôle de la substance P dans les POAN, des souris ayant été spinalisées et injectées avec de la CDTX (modèle de Genêt et coll.), se voyaient administrer un antagoniste sélectif du récepteur NK1R, le RP67580, visant à bloquer l'action de la substance P. Les souris du groupe contrôle recevaient le véhicule seul. L'administration de RP67580 a permis de réduire de 30% le volume des OHN comparativement au groupe contrôle ($p=0,04$), indiquant que la substance P semble contribuer au développement ainsi qu'à la sévérité des OHN [221].

Le taux de substance P a, par ailleurs, été dosé dans le plasma de patients avec POAN et comparé à des

sujets sains volontaires. La concentration plasmatique en substance P était significativement plus élevée dans le plasma des sujets avec POAN comparativement au sujets sains ($p=0,002$) [221].

2.5.4 Perspectives

Les travaux réalisés chez les patients après lésion du SNC et dans le modèle murin développant des OHN ont montré que l'OSM, les tyrosines kinases JAK1 et JAK2 et la substance P pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles pour contrer l'apparition de OHN et par extension de POAN. Cependant, d'autres cytokines inflammatoires, telles que l'interleukine-1 bêta (IL-1 β), sont également dérégulées chez les patients neurologiques et leurs rôles dans la pathogenèse des OHN et des POAN restent à identifier (Alexander KA, Tseng HW, Girard D, Genet F, Banzet S, Levesque JP, résultats non publiés).

Par ailleurs, les risques liés à l'utilisation de telles drogues, à une phase précoce de prise en charge, dans les suites d'une atteinte neurologique grave restent à identifier.

2.6 Macrophages et cytokines

2.6.1 Rôle clef des macrophages activés

Le modèle murin de Genêt et coll. a mis en évidence le rôle clef des macrophages activés dans la genèse des OHN [221]. En effet, une déplétion totale des cellules phagocytaires (macrophages et ostéoclastes) avec du clodronate chargé dans des liposomes, avait permis de réduire d'un facteur 11, la taille des OHN lorsqu'on compare au groupe contrôle ($p < 0,05$) [221,278]. Ceci prouve que les phagocytes infiltrant le muscle endommagé par la cardiotoxine jouent un rôle majeur dans le développement d'OHN. Un rôle des ostéoclastes a été exclu car l'administration concomitante de zoledronate, biphosphonate permettant de détruire sélectivement les ostéoclastes, augmentait la taille des OHN dans ce modèle [221].

Ces observations concordent avec les expériences réalisées sur des souris sauvages où la déplétion des macrophages (ostéomacs), présents dans l'os de façon physiologique, provoquait une perte rapide des ostéoblastes et stoppait la formation osseuse [214]. De plus, la déplétion des macrophages d'une culture de cellules souches mésenchymateuses permettait de prévenir leur différenciation en ostéoblastes, alors que leur réintroduction, rétablissait la différenciation ostéogénique des cellules souches.

Les ostéomacs assurent également un rôle dans le maintien de la fonction des niches hématopoïétiques de cellules souches mésenchymateuses. Une déplétion de ces macrophages provoque une perte de la fonction des niches hématopoïétiques par la fuite des cellules souches depuis la moelle osseuse vers le sang circulant [214]. De façon assez similaire aux os longs, les OHN sont bien structurées avec la présence d'une moelle osseuse hématopoïétique. Cette population de macrophage est donc indispensable à la différenciation ostéoblastique, au maintien de la fonction de la moelle

osseuse hématopoïétique et participe, également, au développement des OHN [3].

Il a été préalablement montré que deux catégories de macrophages sont recrutées sur les lieux de fractures osseuses et de régénération musculaires : les M 1, macrophages pro-inflammatoires survenant à la phase initiale et les M 2, macrophages anti-inflammatoires, supportant la réparation tissulaire et intervenant plus tardivement. Il est possible que dans les OHN, l'un ou l'autre de ces macrophages, voire les 2 participent à la genèse des OHN et par extension, des POAN.

Les macrophages sont responsables de la sécrétion de plusieurs cytokines inflammatoires : l'Oncostatine M, les BMP et les IL, entre autres.

2.7 Cellules musculaires progénitrices

L'origine cellulaire des POAN est encore mal connue. Comme l'écrivent Lees-Shepard et coll. dans leur article, il est raisonnable de penser que seul un faible nombre de types cellulaires adultes ait le pouvoir de se différencier en cellules osseuses [279]. Les cellules progénitrices conduisant à la formation de POA peuvent avoir deux origines. Elles peuvent être présentes localement dans le muscle et son tissu conjonctif, ou bien, provenir de la circulation sanguine.

Genêt et coll. avaient montré le potentiel ostéogénique de plusieurs types cellulaires provenant du muscle de souris naïves après 3 semaines de mise en culture dans un milieu ostéogénique : cellules satellites (Sca1-CD34+), interstitielles (Sca1+CD34+) et souches progénitrices (Sca1-CD34-) ; et de la moelle osseuse : cellules souches mésenchymateuses (CD31-Sca1+ et Sca1-CD34-) [221]. Des résultats similaires étaient trouvés lors de la mise en culture de cellules musculaires prélevées autour de POAN excisées au bloc opératoire [221]. Ces résultats suggéraient que les POAN pouvaient provenir de la différenciation de cellules présentes dans le muscle.

Cependant, il peut exister une différence de résultats entre études réalisées *in vivo* et *in vitro* illustrant la nécessité d'interpréter les résultats issus des systèmes de cultures cellulaires avec précautions car ils sont réalisées dans des environnements encourageant l'ostéogénèse et peuvent conduire à des résultats différents *in vivo* [279].

L'étude de la provenance des cellules pouvant être impliquées dans le développement de POA a été facilitée ces dernières années par le marquage cellulaire (Cre/LoxP) et les techniques de transplantation cellulaires permettant de suivre leur mouvement et de confirmer ou non leur potentiel ostéogénique.

Nous avons vu précédemment (1.1.3. Régénération musculaire) que les cellules satellites du muscle sont la principale source permettant la réparation du tissu musculaire en condition physiologique

[178]. Elles s'activent en réponse à un traumatisme musculaire et prolifèrent rapidement générant un grand nombre de myoblastes qui se différencient ensuite en myocytes, puis fusionnent pour former les myotubes [178]. Bien que ces cellules soient essentiellement destinées à assurer la régénération musculaire, elles ont rapidement été identifiées comme étant de bon candidats à la formation de POA car elles sont uniquement trouvées dans le muscle et présentent un potentiel ostéogénique lorsqu'elles sont mises en cultures avec du BMP [280]. Toutefois, les études utilisant le marquage cellulaire et la technique de transplantation montrent clairement que les cellules satellites ne contribuent pas à la survenue de POA *in vivo* que ce soit dans les formes génétiques d'ossifications hétérotopiques ou les POA acquises [281–283].

En plus des cellules satellites, dans le muscle squelettique adulte, résident d'autres types cellulaires pouvant jouer un rôle dans le processus de régénération musculaire et possédant un potentiel de différenciation ostéogénique.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentes dans la moelle osseuse ont plusieurs fois montré leur capacité à l'élaboration d'une ossification endochondrale *in vitro*, lorsqu'elles sont mises en culture dans des conditions favorisantes (hypoxie et/ou présence de TDF- β) [284,285]. Dans certains cas, l'implantation *in vivo* de CSM suivant une période de différenciation cellulaire *in vitro*, conduisait à la formation d'os endochondral contenant une moelle osseuse dans une cavité centrale [286]. Parce qu'elles proviennent de la moelle osseuse, les CSM sont toujours considérées comme la source principale de toutes les cellules ostéoprogénitrices que l'on peut trouver dans le corps humain et les études de traçabilité de cette lignée cellulaire indiquent la migration et l'installation intramusculaire des CSM par voie intraveineuse [287]. Cependant, la migration de ces cellules vers le muscle après lésion tissulaire est controversée, remettant ainsi en question leur contribution dans le développement de POAN [288]. Dans une revue de la littérature, Lees-Shepard et coll. suggéraient que l'os ectopique était initié localement par des progéniteurs résidents musculaires, comme les cellules progénitrices mésenchymateuses (CPM), et que les CSM participaient plus tardivement à la croissance et au remodelage osseux [279].

Les CPM sont multipotentes et capables de se différencier en cellules osseuses mais aussi en chondrocytes ou encore, en adipocytes [289].

Une étude clinique a consisté à isoler des CPM de patients polytraumatisés de guerre avec POA versus sans POA [290]. Les auteurs mettaient en évidence un taux plus important de CPM engagées dans la voie d'ostéogénèse dans le muscle des patients polytraumatisés avec POA que dans le groupe de patients sans POA [290]. Par la suite, Jackson et coll. montraient que les CPM présentaient un profil ostéogénique comparable aux CSM issues de la moelle osseuse qui avaient été exposées à un milieu favorisant l'ostéogénèse *in vitro* [291]. Il semblerait qu'un seuil soit à atteindre pour que les CPM aient le pouvoir de se différencier en cellules osseuses. Ce niveau seuil serait dépendant de plusieurs

facteurs associés à la lésion tissulaire comme le niveau de la réponse immunitaire générée, le degré de lésion vasculaire associée et/ou l'hypoxie tissulaire induite [289].

Les cellules interstitielles, aussi appelée progéniteurs fibro-adipogéniques (FAP) ont récemment été décrites comme une population PDGFR α +SCA1+ de cellules multipotentes résidant dans l'interstitium du muscle strié squelettique mais ne sont pas exclusives de ce tissu [179,282,292]. Ces cellules sont toujours trouvées proches des vaisseaux mais sont différentes des péricytes. Bien que les FAP résidents musculaires supportent la régénération musculaire en condition physiologique, il n'ont pas la capacité de contribuer directement à la formation de myofibrilles [292]. L'apparent manque de capacité myogénique associé avec leurs marqueurs de membranes spécifiques, différencient les FAP des autres types de cellules progénitrices résidentes musculaires [179,279]. C'est une population dense au sein du muscle qui joue un rôle clé dans l'homéostasie du tissu, tant dans son fonctionnement normal qu'à l'issue d'une lésion [293,294]. Dans les suites d'un traumatisme, les FAP prolifèrent rapidement. Dans les cas où les FAP ne parviennent pas à revenir à leur niveau pré-traumatique, s'accumule de façon pathologique un tissu grasseux et fibrotique, qui altère l'architecture et la fonction musculaire [179,292,295]. Alors qu'ils ont été nommés initialement d'après leur potentiel fibrogénique et adipogénique, les FAP possèdent aussi un pouvoir ostéogénique après stimulation par un milieu permissif en culture [179,282,292]. Wosczyzna et coll. ont montré que les FAP contribuent de façon majeure à la formation d'OH induit par l'administration de BMP-2 *in vivo* [282].

Le rôle des FAP n'a pas été étudié directement dans les POAN, cependant ces cellules pourraient être incriminées dans leur développement. En effet, cette population cellulaire est directement affectée par la BM (prolifération, fibrose et activation de STAT3-IL-6, voie inflammatoire) [296]. De plus, les FAP sont impliqués dans l'ossification des FOP, à l'inverse il existe des arguments contre l'implication d'autres cellules et notamment, les cellules satellites [279,295]. L'implication de ce type cellulaire dans l'initiation des OHN fait actuellement l'objet de recherche au sein de notre équipe (Pr Banzet, D. Girard, M.C. Le Bousse Kerdiles, Pr Levesque, K.A Alexander, H.W. Tseng, résultats non publiés).

D'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, les péricytes ainsi que les progéniteurs tendineux et ligamentaires ont été évoqués comme étant des précurseurs à l'apparition d'ossifications hétérotopiques [279]. L'implication des cellules endothéliales et des progéniteurs tendineux et ligamentaires dans l'initiation des POA est très controversée. Les études ne permettent pas, aujourd'hui, de conclure à leur participation dans le développement de POA [279].

Les péricytes apparaissent comme de bons candidats à la différenciation ostéoblastique conduisant aux POA car ils ont le pouvoir de se différencier en plusieurs types de cellules mésenchymateuses pendant les processus de réparation tissulaires ainsi que dans certaines pathologies [297]. En revanche, leurs marqueurs cellulaires spécifiques sont encore mal identifiés ce qui ne permet pas à l'heure actuelle de les incriminer formellement dans la formation de POA, notamment par la technique

de marquage cellulaire dans les modèles murins développant des OH [279].

2.8 Différenciation cellulaire vers les POAN

Les analyses histologiques des POA et POAN étaient parfois contradictoires montrant des processus d'ossification tantôt endochondrale, tantôt intramembranaire et parfois, un mélange des deux [298,299].

L'étude de Foley et coll. a récemment permis de préciser les différents types d'ossifications selon la pathologie initiale, sur un grand nombre d'échantillons issu d'exérèse de POA humains [4]. Il n'y avait pas, dans leur échantillon, de formation osseuse ectopique secondaire à une pathologie génétique. La population de patient était essentiellement constituée de POAN : 7 survenues après TC, 2 après BM et 2 après AVC. Six POA sont apparues suite à un polytraumatisme et 2 après arthroplastie.

L'ensemble de tissus provenant de POA montraient l'évidence d'une formation osseuse endochondrale, quel que soit la cause ayant conduit à la formation de POA. Les auteurs n'ont trouvé aucun argument histologique en faveur d'une ossification intramembranaire.

Cette étude a également différencié 6 étapes dans le développement des POA, indépendamment de leur taille et de leur maturité (Figure 24).

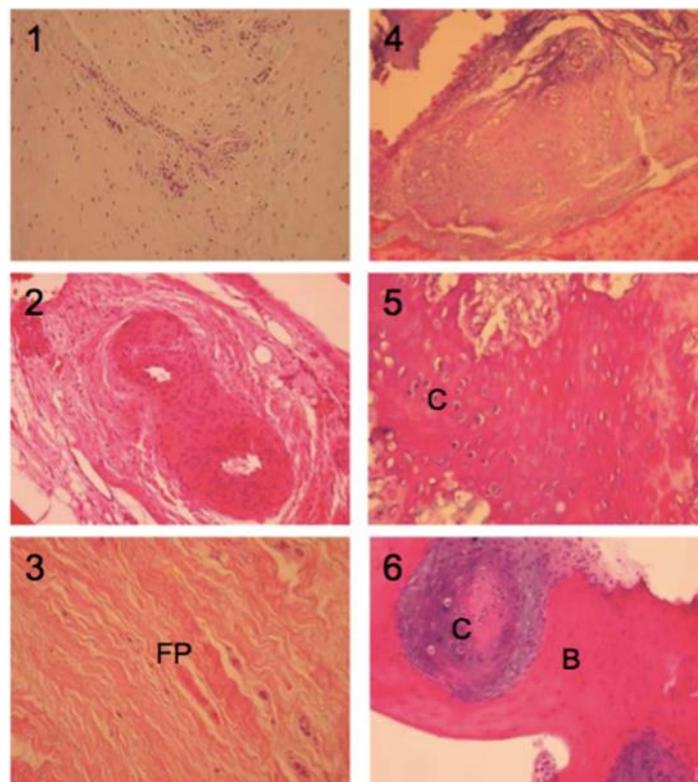


Figure 24. Les 6 étapes de développement des POA.

(1) infiltration lymphocytaire périvasculaire, (2) migration lymphocytaire dans le tissu, (3) Fibroprolifération réactionnelle, (4) néovascularisation, (5) formation cartilagineuse, (6) Formation osseuse endochondrale. Extrait de l'article Foley et coll. [4]

Les lésions les plus précoces montrent une infiltration lymphocytaire avec migration depuis les vaisseaux adjacents vers les tissus mous, principalement le tissu adipeux et fibreux et parfois la migration de ces cellules se faisait vers le tissu musculaire (stades 1 et 2, Figure 24). L'origine lymphocytaire de ces cellules a été confirmée par immunohistochimie ciblant le marqueur membranaire CD45. Les étapes suivantes montraient des aires de fibroprolifération comprenant tissus conjonctif et collagène ainsi que des vaisseaux sanguins natifs (stades 3 et 4, Figure 24). Plus tard, se forment des îlots cartilagineux avec maturation des chondrocytes suivis par la formation d'os endochondral (stades 5 et 6, Figure 24).

La même année, Torrosian et coll ont montré dans des POAN issus de pièces opératoires d'exérèses, la présence d'une véritable niche hématopoïétique, composées de cellules souches multipotentes en plus des ostéoblastes, ostéoclastes, chondrocytes et macrophages précédemment décrits [3,221]. De plus, ils ont confirmé que cette moelle osseuse était bel et bien fonctionnelle en transplantant des souris immunodéficientes, ainsi capables de reconstituer l'ensemble des éléments figurés du sang [3].

Les POA comme les POAN paraissent donc présenter l'ensemble des caractéristiques d'un os haversien. Toutefois, ce processus n'est pas issu de l'embryogénèse mais bien d'un processus pathologique acquis.

V. Articles et Etudes

Cette partie sera divisée en 5 chapitres qui ont fait l'objet d'études non encore publiées, publiées ou en cours de publication.

CHAPITRE	Nom du chapitre	Etat
1	Effet de l'injection d'agents de paroi bactérienne et inflammation induite sur le développement des OHN chez les souris.	Non publié, fera l'objet d'une publication commune avec l'équipe de JP Levesque
2	Etudier l'impact de l'injection intramusculaire de toxine botulique sur le volume des OHN dans le modèle murin : hypothèse de la modulation du signal de la JNM, notamment inflammatoire dans la formation des OHN.	Publié Blocking neuromuscular junctions with botulinum toxin A injection enhances neurological heterotopic ossification development after spinal cord injury in mice Annals of Physical and Rehabilitation Medicine, Volume 62, Issue 3, May 2019, Pages 189-192 https://doi.org/10.1016/j.rehab.2019.01.005
3	Etudier les facteurs inflammatoires intervenant dans les processus de formation de POAN à un stade précoce suivant un traumatisme crânien chez l'Homme.	En cours de révision dans Journal Of Head Trauma Rehabilitation Traumatism brain injury: if neurological damage was not the key to the development of neurogenic heterotopic ossification?
4	Etudier l'efficacité sur la douleur d'un traitement par infiltration de corticoïdes au site de développement de POAN chez l'Homme.	En cours de révision dans Disability and Rehabilitation Corticosteroid injection is an alternative therapeutic strategy to treat pain in Neurogenic Heterotopic Ossification: a Case Series.
5	Création d'une banque de données clinico-biologiques chez des patients hospitalisés en services de soins aigus pour la recherche de marqueurs spécifiques prédictifs, notamment inflammatoires, du développement précoce de POAN chez l'Homme « BENTHOS ».	Demande de financement en cours National Health and Medical Research United States Department of Defense

CHAPITRE 1 : Effet de l'injection d'agents de paroi bactérienne et inflammation induite sur le développement des OHN chez les souris.

1. Introduction

L'inflammation semble être un élément essentiel à la constitution de POA. En effet, l'inflammation apparaît comme le dénominateur commun de l'ensemble des pathologies dans lesquelles on peut voir se développer des POA acquises: brûlure étendues [21], amputations traumatiques [158], affections neurologiques centrales [65,92], long séjour en réanimation [159]. Les études cliniques rétrospectives s'accordent à dire que les patients à risque de développer des POAN sont porteurs de lourdes séquelles neurologiques (atteinte médullaire complète, déficit moteur, hypertonie spastique) et ayant développé de nombreuses complications (infections urinaires et pulmonaires, thromboses veineuses profondes, escarres). Ces facteurs sont pourvoyeurs d'inflammation mais ce terme est assez général. Nous allons tenter de préciser son rôle dans la genèse de POAN au travers de ce travail.

On imagine l'inflammation comme pouvant être « systémique », en conséquence à l'accident neurologique central et des lésions associées mais aussi « locale » par atteinte des tissus péri-articulaires. En effet, à la phase précoce, l'inflammation « systémique » peut être « aspécifique » et liée à l'atteinte du système nerveux central (stress, dysrégulation du système nerveux autonome et du système immunitaire) mais aussi aux défaillances d'organes associées (fractures de membres, atteintes thoracique, abdominale, périnéales...), à des chirurgies, à l'utilisation de drogues interférents avec les mécanismes de l'inflammation. L'inflammation « systémique » peut également être « spécifique » d'une infection bactérienne. En l'absence d'infection, on peut également imaginer qu'une circulation bactérienne puisse se faire par translocation bactérienne depuis le tube digestif dans le cadre d'un stress aigu.

Pour tenter de préciser ces mécanismes, la première partie de ce travail de thèse sera axé sur l'exploitation du modèle murin développant des OHN. Dans un souci de clarté, il s'agira tout d'abord, de décrire le modèle animal développant des OHN. Ensuite, nous étudierons l'effet de deux produits de dégradation d'agents infectieux, les Lipopolysaccharides (LPS) puis l'acide Lipoteichoic (LTA) comme médiateur inflammatoire sur la taille des OHN. Afin de se rapprocher de la pathologie humaine, nous observerons enfin, l'effet de l'administration systémique de LPS sur la taille des OHN.

2. Matériel et méthode général du modèle murin développant des OHN

2.1 Population

L'ensemble des procédures expérimentales utilisées dans nos études ont été approuvées par le comité

d'éthique d'expérimentation animale de l'Université du Queensland (Australie). Les expériences que nous avons réalisées impliquaient toutes des souris femelles, C57BL/6, âgées entre 5 et 6 semaines. Ces souris provenaient de l' « Animal Resource Centre » (Perth, Australie). La souris *Mus musculus* a été choisie car son génome est bien caractérisé et il existe de nombreuses souches consanguines homogènes et de nombreuses souches avec des modifications génétiques bien identifiées pour étudier la pathogenèse de différentes maladies au niveau moléculaire.

2.2 Procédures expérimentales

Les souris étaient anesthésiées par une injection intrapéritonéale (IP) de 100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine, préalablement reconstitués dans une solution saline stérile. Le mélange était injecté à une dose de 100 µL/10 g de poids corporel. Les animaux recevaient de l'isoflurane 1%, en inhalation au masque, s'ils n'étaient pas suffisamment anesthésiés. Une laminectomie était réalisée en T11 et T12. On procédait ensuite à la section médullaire chirurgicale à l'aide d'un scalpel, entre ces 2 mêmes vertèbres, en condition stérile. Enfin, les muscles et la peau étaient suturés. Les animaux SHAM pour la lésion médullaire étaient anesthésiés selon le même protocole, la peau et les muscles étaient incisés en regard de T11 et T12 puis suturés, sans laminectomie. Avant d'être suturés et toujours sous anesthésie générale, les souris recevaient une injection de CDTX (L8102, Latoxan, France) à la dose de 0.32 mg/kg dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière droite. La patte controlatérale servait de contrôle et était injectée avec un volume équivalent de PBS. Après suture des muscles et de la peau, les souris recevaient une injection sous cutanée de 20mg/kg de ciprofloxacine pour prévenir une éventuelle infection du site opératoire et de la buprenorphine à la concentration de 0.075mg/kg à visé antalgique. Les souris étaient ensuite laissées sur une plaque chauffante à 37°C jusqu'à leur réveil avant de regagner leur cage d'origine. Pour prévenir la survenue d'infections urinaires sur vessie neurologique suite à la section médullaire, les vessies étaient vidangées manuellement 2 fois par jour par des mouvements délicats d'expression vésicale et du sulfaméthoxazole/triméthoprim (Bactrim® ; sirop pédiatrique, 50/10 mg/kg) était administré par voie orale et mélangé à l'eau de l'abreuvoir. Les souris étaient autorisées à bouger librement dans la cage et disposaient de nourriture et d'eau *ad libitum*. Un examen soigneux était effectué de façon quotidienne tout au long de l'expérience.

2.3 Préparation des échantillons

Les souris étaient euthanasiées par asphyxie au CO₂ 7 jours après la chirurgie. La peau et les viscères étaient retirés. Le bassin et les membres inférieurs étaient prélevés en un bloc et placés dans un tube de 50 ml rempli de paraformaldéhyde 4% dans une solution de 0.15M NaCl tamponnée avec 10mM de phosphate de sodium pH=7.4 (PBS) fraîchement préparé. Les échantillons étaient ensuite disposés sur une plaque rotatoire en chambre froide à 4°C et le paraformaldéhyde était changé à 24 heures. Après 48 heures, les tubes étaient vidés et le paraformaldéhyde était remplacé par du PBS contenant 0,1% de

NaN₃.

2.4 Acquisition scannographique

L'acquisition scannographique a été réalisée une fois les échantillons fixés par le paraformaldehyde et placés dans le PBS. Le système Inveon PET-CT (360° rotation, 180 projection, 80kV and 500 μ A) (Siemens, Medical Solutions Inc.) a permis d'obtenir des images avec une résolution de 36 μ m et une reconstruction d'images de l'échantillon en 3 dimensions (3D) à partir des acquisitions axiales. La détection et l'analyse quantitative du volume des OHN se faisait par une technique de soustraction entre la masse musculaire entourant les OHN et le squelette osseux de la souris (hanche, fémur, tibia, fibula).

2.5 Analyses statistiques

Les données quantitatives sont exprimées par la médiane et la distance inter-quartiles [IQR]. Les comparaisons univariées utilisent le test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives. Les comparaisons multivariées utilisent le test Kruskal-Wallis. Tous les tests statistiques utilisés donnent des valeurs significatives pour une valeur de $p < 0.05$. Les analyses statistiques sont réalisées à partir du logiciel GraphPad Prism version 8 (GraphPad Softwares, La Jolla, CA).

3. Inflammation étudiée au travers du modèle murin développant des OHN

3.1 Inflammation locale, intramusculaire par des lipopolysaccharides

3.1.1 Objectif

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet d'une inflammation locale, intramusculaire, sur la taille des POAN en utilisant un modèle de souris lésés médullaires, développant des OHN.

3.1.2 Matériel et méthode supplémentaire

Le LPS, composant de la paroi des bactéries Gram-négatives, a été utilisé pour stimuler l'inflammation locale. Il était purifié à partir de la paroi d'*Escherichia Coli O111: B4*. Le LPS a été injecté à différentes doses sous forme de titration (de 0,023 à 1,25 mg/kg), alors que la cardiotoxine était injectée à la même dose dans tous les groupes (0,32 mg/kg).

Nous avons comparé deux groupes de souris spinalisées, le premier groupe (n=8) recevait une injection de CDTX seul dans les ischio-jambiers de patte arrière droite et le second groupe (n= 4 à 8 pour chaque concentration de LPS), une injection concomitante de cardiotoxine et de LPS dans le même site. Un troisième groupe (n=7) était SHAM pour la BM et se voyait injecter de la CDTX en association à du LPS selon le même schéma de titration de dose (figure 25). La patte arrière gauche servait de contrôle et était injectée de PBS. Les résultats combinent 2 expériences indépendantes avec 4 souris dans chaque groupe. Seul le groupe SHAM + LPS 0,605 mg/kg ne comportait que 4 souris.

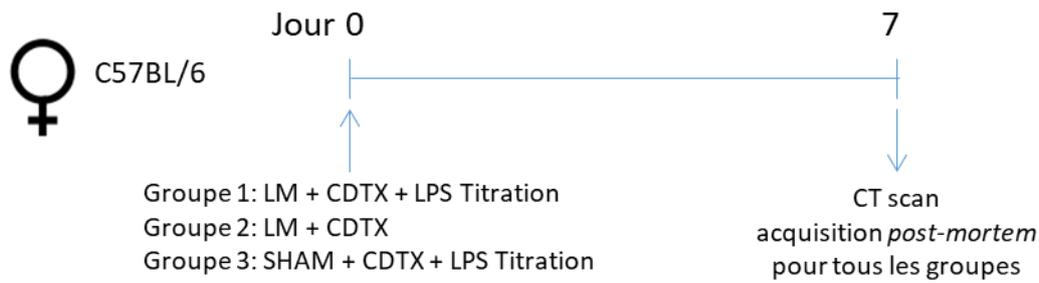


Figure 25. Schéma expérimental

3.1.3 Résultats

La médiane du volume des OHN dans le premier groupe, après BM + CDTX, était de 15.75 mm³ [8.7 ;17.0].

Dans le second groupe de souris BM, injecté avec des concentrations croissantes de LPS, la médiane allait de 4.75 mm³ [1.7 ;18.1] pour la plus faible concentration de LPS (0.023 mg/kg), à 91.5 mm³ [62.8 ;110.6] pour la plus forte concentration de LPS (1.25 mg/kg). Les résultats révélèrent que l'injection concomitante de LPS et de CDTX chez une souris spinalisée, augmentait de façon significative la taille des OHN dès lors que la concentration de LPS est supérieure à 0.605 mg/kg ($p=0.027$, *Kruskal-Wallis test*) (Figure 26 A et C) et que cette augmentation était dose-dépendante.

Dans le troisième groupe, SHAM pour la BM, aucune OHN n'était visible à 7 jours de la chirurgie, dans la patte injectée de CDTX comme la patte injectée de PBS. De façon étonnante, on voyait des ossifications apparaître dans le groupe SHAM pour la BM, lorsque la CDTX et le LPS étaient administrés de façon concomitante en IM (Figure 26 B). La médiane était de 0,6 mm³ [0.1 ; 1.8] pour la plus faible concentration de LPS (0,023 mg/kg) et de 64.9 mm³ [24.3 ; 86.6] pour la plus forte concentration de LPS (1,25 mg/kg). Comme pour le groupe avec BM, l'augmentation du volume des OHN suit également une distribution dépendante de la concentration de LPS injectée. Lorsqu'on compare le volume des OHN dans le groupe BM et le groupe SHAM pour la BM, on s'aperçoit qu'il existe une différence significative entre les 2 groupes pour les différentes concentrations de LPS injectées ($p<0,05$, *Mann-Whitney test*) à l'exception de 0,605 mg/kg et 1,25 mg/kg (Figure 26 C).

Pour tous les groupes, aucune OHN n'a été visualisée dans la pattes arrière gauche injecté par du PBS.

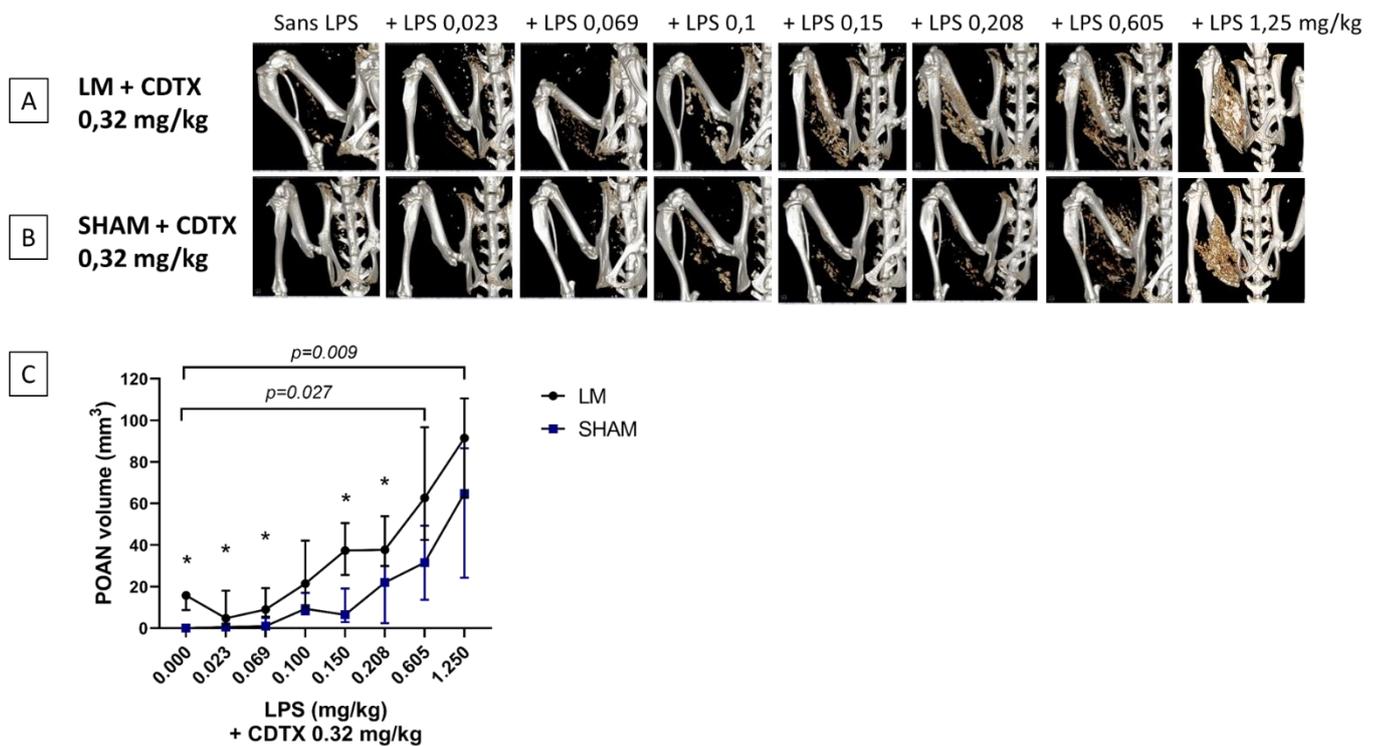


Figure 26. Volume des POAN (OHN) 7 jours après chirurgie (BM ou SHAM) et injection de CDTX +/- LPS (n=4 à 8 par groupe)

(A) Représentations scannographiques en 3 dimensions des OHN après BM et injection systématique dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière droite, de 0,32 mg/kg de CDTX +/- injection de LPS à des concentrations progressivement croissantes; (B) Représentations scannographiques en 3 dimensions des OHN du groupe SHAM pour la BM ayant reçu une injection IM de CDTX +/- LPS à des concentrations progressivement croissantes; (C) Volume des OHN en fonction des concentrations de LPS (mg/kg) injectées de façon concomitante à de la CDTX 0,32 mg/kg dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière droite chez des souris BM (rond noir) ou SHAM pour la BM (carré bleu); les résultats sont exprimés en médiane et interquartile; comparaison des différents dosages de LPS chez les souris BM avec le test Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$, test de Mann-Whitney.

3.2 Inflammation locale musculaire par l'acide lipoteichoic

3.2.1 Objectifs

Nous avons vu précédemment chez des souris spinalisées que la présence intramusculaire de LPS, produit de dégradation de membrane issus de bactéries BGN, additionné à la CDTX, augmentait le volume des POAN. Nous avons cherché à valider cette hypothèse pour un dérivé de la paroi de bactérie Cocci Gram Positif (CGP), l'acide lipoteichoic (LTA).

3.2.2 Matériel et méthode supplémentaire

La paroi des bactéries CGP n'est pas composée de LPS mais de couches successives de peptidoglycanes ancrés dans la membrane plasmique par des molécules d'acide lipoteichoic. Dans ces expériences, nous avons utilisé un LTA purifié provenant de *Staphylococcus aureus*. Le LTA a été injecté à différentes doses sous forme de titration allant de 1 à 10 mg/kg, alors que la cardiotoxine était injectée à la même dose dans tous les groupes (0,32 mg/kg).

Nous avons comparé deux groupes de souris spinalisées, le premier groupe (n= 8) recevait une injection de CDTX seul dans les ischio-jambiers de patte arrière droite et le second groupe (n= 10 pour chaque concentration de LTA), une injection concomitante de cardiotoxine et de LTA dans le même site. Un troisième groupe (n=4) était SHAM pour la BM et se voyait injecter de la CDTX en association à du LTA selon le même modèle de titration de 1 à 10 mg/kg (figure 27).

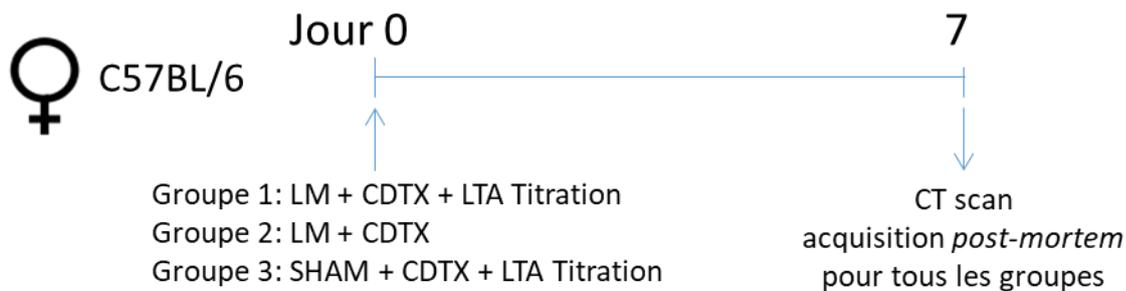


Figure 27. Schéma expérimental

3.2.3 Résultats

La médiane du volume des OHN dans le groupe contrôle avec BM + injection de CDTX seule était de 11,8 mm³ [7.7 ;15.2]. Dans les groupe BM + CDTX + LTA, la médiane du volume des OHN augmentait avec la concentration de LTA administrée. Ainsi pour la plus faible concentration de LTA (1mg/kg), la médiane du volume des OHN était de 24,3 mm³ [17.6 ;29.9] et augmentait jusqu'à 44,4 mm³ [35.8 ;59.1] pour la dose de 10mg/kg de LTA administrée (figure 28). Chaque groupe de souris spinalisées et injectées de CDTX + LTA était comparé au groupe contrôle ayant reçu uniquement de la CDTX. Les volumes des OHN dans les groupes injectés par du LTA étaient statistiquement plus important en comparaison aux volumes des OHN du groupe contrôle ayant reçu une administration de CDTX isolée et ceux, quel que soit la concentration de LTA injectée (figure 28). Par ailleurs, chez les souris SHAM pour la BM, on pouvait observer l'apparition de OH avec un volume supérieur ou égal à 1mm³ dès 5mg/kg de LTA injecté de façon concomitante à la CDTX. Les volumes mesurés restaient très faibles comparativement aux volumes des souris spinalisées recevant la même dose de CDTX et LTA avec des différences nettement significatives (figure 28).

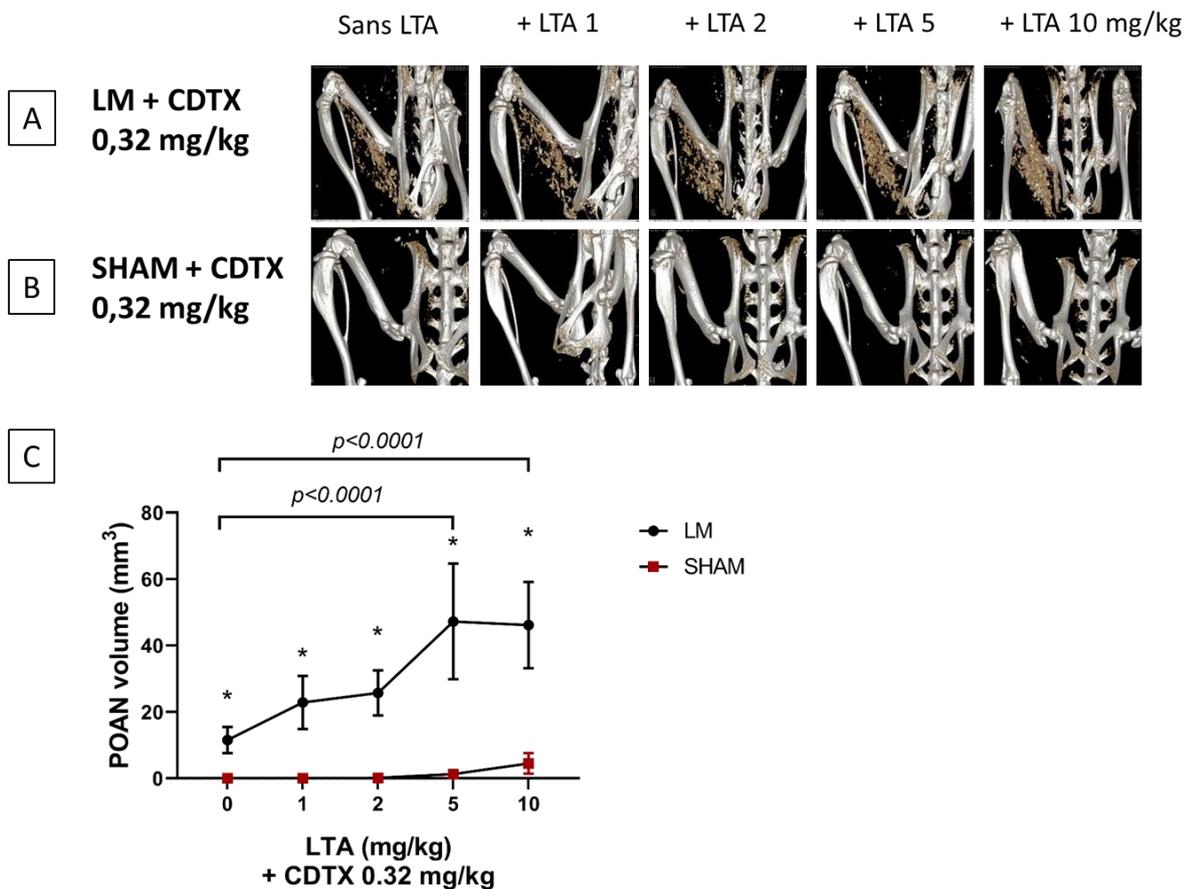


Figure 28. Volume des OHN 7 jours après chirurgie (BM ou SHAM) et injection de CDTX +/- LTA (n=4 à 10 par groupe)

(A) Représentations scannographiques en 3 dimensions des OHN après BM et injection systématique dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière droite, de 0,32 mg/kg de CDTX +/- injection de LTA à des concentrations progressivement croissantes; (B) Représentations scannographiques en 3 dimensions des OHN du groupe SHAM pour la BM ayant reçu une injection IM de CDTX +/- LTA à des concentrations progressivement croissantes; (C) Volume des OHN en fonction des concentrations de LTA (mg/kg) injectées de façon concomitante à de la CDTX 0,32 mg/kg dans les muscles ischio-jambiers de la patte arrière droite chez des souris BM (rond noir) ou SHAM pour la BM (carré rouge) ; les résultats sont exprimés en médiane et interquartile ; comparaison des différents dosages de LPS chez les souris BM avec le test Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$, test de Mann-Whitney.

3.3 Inflammation systémique

3.3.1 Objectifs

Basé sur les observations précédentes, ce travail a cherché à déterminer si une inflammation systémique à la phase aiguë suivant l'atteinte neurologique, était capable d'engendrer, comme l'inflammation locale, une augmentation de taille des OHN. En effet, en pathologie humaine, aucune inoculation de LPS ou de LTA ne se produit de façon locale. Lorsqu'un patient est victime d'un accident neurologique, il peut présenter une inflammation systémique en lien avec l'atteinte neurologique, les traumatismes associés ou encore des complications infectieuses. Il n'y a pas, à notre connaissance, de cas rapportés dans la littérature de patiente avec OHN présentant une infection péri-articulaire causée par un agent infectieux. En revanche, les fractures articulaires ou péri-articulaires des grosses articulations survenant lors de l'atteinte neurologique peuvent être le siège de formation de OHN

[166]. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la formation de OHN chez l'homme, nous avons administré du LPS en intra-péritonéal (IP) pour mimer une inflammation systémique.

3.3.2 Matériel et méthode supplémentaire

Dans ce travail l'ensemble des souris ont eu de manière constante, une BM, une injection IM de CDTX 0.32 mg/kg dans la patte arrière droite et une injection du volume équivalent de PBS dans la patte arrière gauche. Nous avons ensuite comparé trois groupes de souris. Le premier a reçu une seule injection IM de LPS 0.15mg/kg simultanément à l'injection de CDTX. Le second a bénéficié de 3 injections IP de LPS à la concentration de 1,25mg/kg et différées de 2, 4 et 6 jours par rapport à la chirurgie. Le troisième groupe, comprenait des souris spinalisées avec injection de CDTX seule et servait de groupe contrôle (Figure 29 A).

Le choix de l'injection répétée de LPS en IP dans le groupe 2 avait pour objectif de mimer les infections que peuvent contracter les patients à la phase aigüe de l'accident neurologique, lors de leur séjour hospitalier (réanimation, chirurgie orthopédique...). Pour le groupe injecté IP, la concentration de 1,25 mg/kg et une première injection à 48 heures de la chirurgie ont été choisies au vue de résultats préliminaires déterminant la dose de LPS à administrer et le délai de la première injection sans risquer d'induire de souffrance ou la mort de souris déjà fragilisées par la chirurgie et l'injection concomitante de CDTX. Concernant le groupe avec injection IM, la concentration de LPS retenue était de 0,15 mg/kg et correspond à la dose minimale de la titration de LPS qui, injectée de façon concomitante à la CDTX chez une souris spinalisée, permettait l'augmentation significative du volume des OHN dans l'expérience « 3.1 Inflammation locale, intramusculaire par des lipopolysaccharides ».

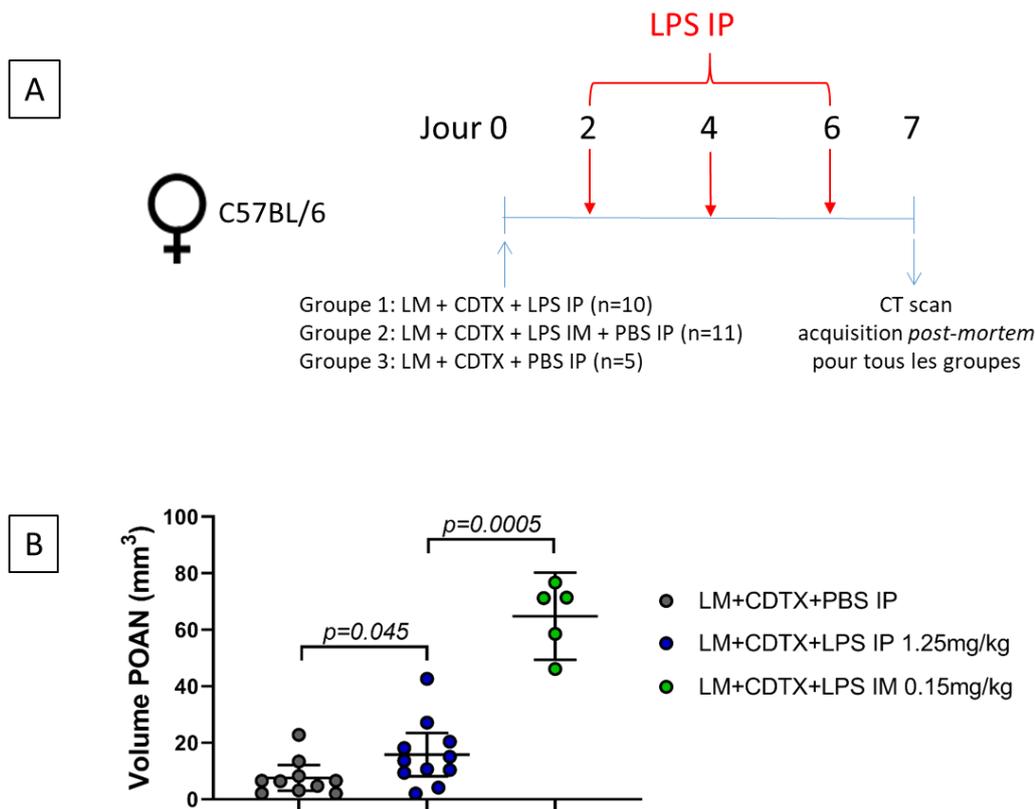


Figure 29. Volume de OHN à 7 jours de la chirurgie + injection IM de CDTX avec injection IM de LPS ou injection IP de LPS ou PBS

(A) schéma expérimental ; (B) Volume des OHN dans les différents groupes traités par BM+CDTX (rond gris), groupe BM+CDTX+LPS IP (rond bleu) et groupe BM+CDTX+LPS IM (rond vert) ; les résultats sont exprimés en médiane et interquartile ; * $p < 0,05$, Mann-Whitney test.

3.3.3 Résultats

La médiane du volume des OHN à 7 jours de la chirurgie était de 6.5 mm³ [2.9 – 9.5] pour le groupe contrôle avec BM+CDTX+PBS IP. Pour le groupe BM+CDTX+LPS IP 1.25mg/kg, la médiane du volume des OHN était de 13.6 mm³ [9.4 – 20.4] et de 71.2 mm³ [52.3 – 74.1] pour le groupe BM+CDTX+LPS IM 0.15mg/kg.

Les résultats mettent en évidence un volume des OHN significativement plus important dans le groupe BM+CDTX+LPS IP par rapport au groupe BM+CDTX+PBS IP ($p=0.045$). La taille des OHN était cinq fois supérieure dans le groupe BM+CDTX+LPS IM comparativement au groupe BM+CDTX+LPS IP ($p=0.0005$).

3.4 Discussion et conclusion

Les expériences 3.1 et 3.2 indiquent qu'une nécrose cellulaire, induite par l'injection de CDTX dans un contexte de BM est indispensable à l'initiation d'une OHN. Dans le groupe BM, l'injection de CDTX est suffisante pour induire un processus d'ossification intramusculaire. En revanche, l'injection de CDTX seul et sans BM, ne permet pas le développement de OH. De même, nous avons montré dans une étude

préliminaire, que l'injection IM de LPS seul, dans un contexte de BM, ne suffisait pas au développement de OHN, même à forte concentration (voir partie III 2.2.3 et Figure 25) [224].

Si la CDTX associée à une BM est suffisante à la formation de OHN, l'inflammation supplémentaire créée par l'injection de LPS et de LTA, exacerbe le volume des OHN, avec un effet dose-dépendant. Il semble donc que l'inflammation participe largement à la croissance des OHN et que plus l'inflammation est importante, plus les OHN sont volumineux. Cette observation est importante car en pratique clinique, les OHN symptomatiques sont généralement de grande taille et sont ceux qui font l'objet d'une résection chirurgicale.

Le LPS et le LTA sont deux agents pathogènes largement utilisés en recherche fondamentale pour induire une inflammation. Ils stimulent le système immunitaire inné via des Toll like receptors (TLR), une grande famille de récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes ou PAMPs (pathogen-associated molecular-patterns). Le LPS issu de la paroi d'*Escherichia Coli* stimule le TLR4 alors que le LTA, un constituant de la paroi de *Staphylococcus aureus* (CGP), stimule les récepteurs TLR2 et TLR6. Le LPS et LTA sont capables d'activer de multiples cascades de signalisation communes conduisant à l'enclenchement de processus inflammatoires (production de cytokines, apoptose). Il existe plusieurs façons d'y parvenir : via le myddosome par la liaison du LPS et LTA à leurs récepteurs TLR4 et TLR2/TLR6, le complexe TLR-myddosome peut être membranaire ou internalisé dans la cellule, ou via l'activation de l'inflammasome, NLRP3 pour le LPS et NLRP7 pour le LTA (Figure 30)[300].

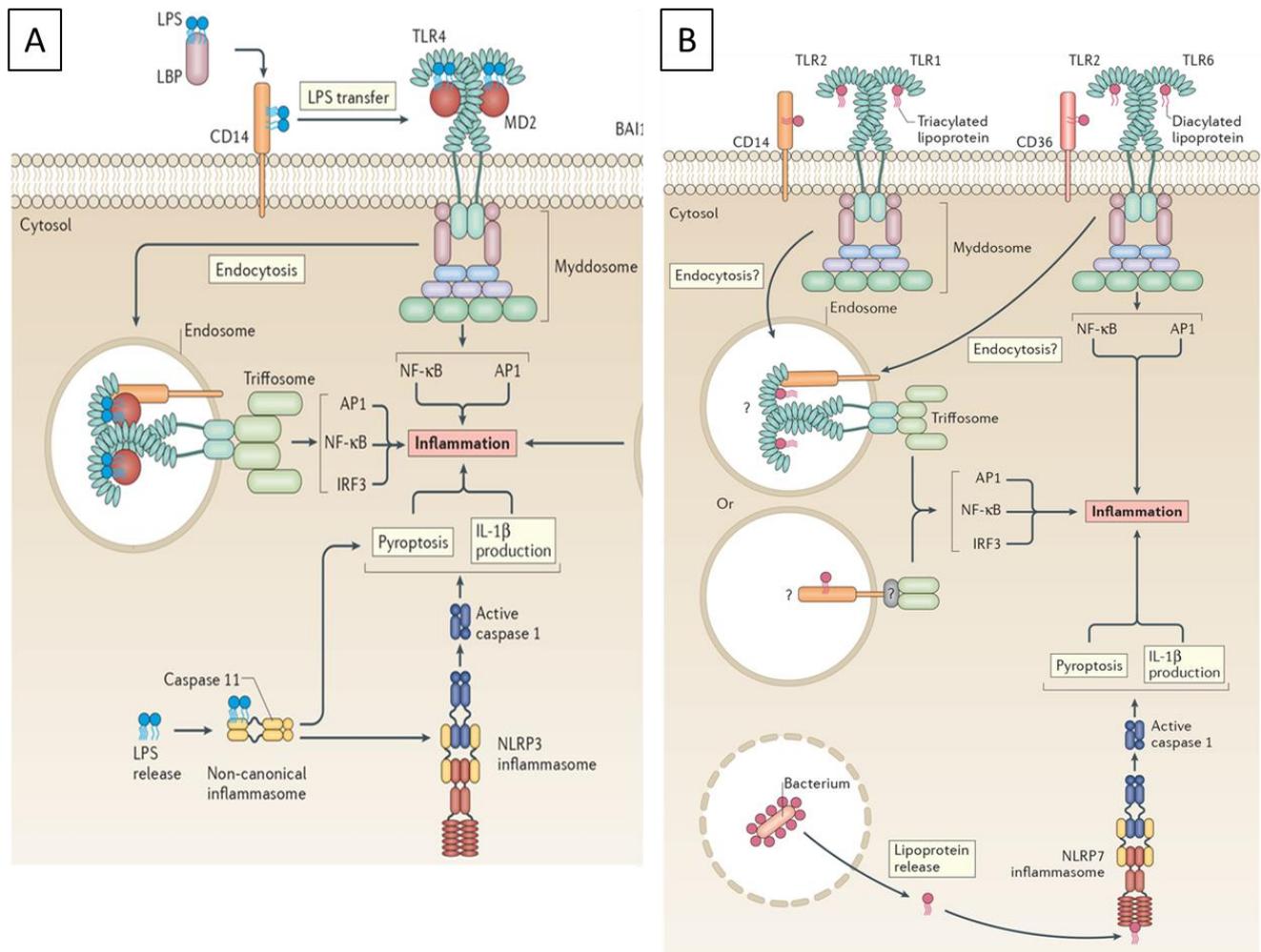


Figure 30. Récepteurs et voies de signalisations induisant une réponse inflammatoire au LPS et LTA.

(A) Trois récepteurs induisant l'activation de quatre voies de signalisation en réponse à l'inoculation de LPS et conduisant à l'inflammation. (B) Trois récepteurs et voies de signalisations en réponse à l'inoculation de LTA pour promouvoir l'inflammation. Extrait de l'article de Kieser et coll. [300]

De façon surprenante dans les études 3.1 et 3.2, l'injection IM de LPS ou de LTA en association avec la CDTX chez les souris SHAM pour la BM, permettait la formation de OH et leur volume augmentait avec la concentration de LPS ou de LTA administrée. Les résultats de l'étude 3.1 montrent une différence non significative entre le groupe BM vs SHAM à partir de 0,605 mg/kg de LPS injecté en présence de CDTX. Il existe donc un effet seuil au-delà duquel il y a assez de LPS pour faire des OH sans BM. Lorsque l'inflammation, causée par de larges doses de LPS et LTA, est suffisamment importante, elle peut devenir suffisante pour induire la formation de OH sans BM. En revanche, il y a toujours besoin d'une destruction musculaire comme celle provoquée par la cardiotoxine. Par extension, l'inflammation apparaît comme le dénominateur commun entre les différentes pathologies pouvant se compliquer de OH. En effet, la littérature décrit des pathologies à haut niveau d'inflammation (brûlures étendues, amputation, long séjour en réanimation) dans lesquelles se développent de volumineux OH et ceux indépendamment d'une lésion neurologique centrale [21,142,158]. De même, des modèles murins de OH après brûlure ou amputation suite à une explosion (blast) ont été publiés et

ne font pas intervenir de lésion neurologique centrale [301,302]. Dans le cas des OHN, la lésion neurologique pourrait participer à élever le niveau d'inflammation nécessaire à leur formation et leur croissance. Si l'on prend l'exemple des grands brûlés, ils présentent une atteinte profonde des tissus mous dont le muscle, un grand déséquilibre hydro-sodé source de stress et contractent souvent des infections cutanées, amenant LPS et LTA (voir partie II Facteurs de risque divergents et Tableau 1). L'association entre atteinte musculaire et inflammation (spécifique par les infections et non spécifique via le déséquilibre hydro-sodé) peut alors expliquer que le seuil requis pour le développement d'OH soit atteint sans contexte de lésion neurologique centrale.

Si le LPS et le LTA sont deux agents capable d'induire une inflammation, le fait qu'ils soient issus de parois bactériennes nous amène à penser que cette inflammation pourrait être spécifique et en rapport avec des infections à BGN ou CGP. En effet, nous avons pu voir dans la partie II que la présence d'infections est considérée comme un facteur de risque commun de développement des OH et des OHN (Tableau 1). Il est donc possible que les pathogènes infectieux porteurs de LTA et LPS induisent, chez l'animal comme l'humain, une augmentation du volume des OHN conduisant ainsi à la formation d'OHN cliniquement gênants. Cette hypothèse a été testée à l'échelle humaine au travers d'une étude rétrospective faisant l'objet du chapitre 3. Ce travail a été mené chez des patients traumatisés crâniens à un stade très précoce suivant leur accident et cherchait des facteurs inflammatoires et infectieux qui pourraient favoriser l'apparition d'OHN chirurgicaux.

N'ayant que très peu de traumatisme ou d'inflammation locale en pratique clinique, nous avons fait l'hypothèse que l'inflammation systémique pourrait également être à l'origine d'une augmentation de la taille des OHN. Ce point est abordé en 3.3 de ce chapitre. Dans cette étude, l'injection systémique de LPS chez des souris BM+CDTX permettait de doubler le volume des OHN lorsqu'on compare au groupe contrôle n'ayant pas reçu de LPS. En revanche, l'injection locale de LPS en association avec la CDTX induisait des OHN très volumineuses (x5) en comparaison avec le volume d'OHN après injection systémique de LPS.

La limite principale de cette étude est la temporalité des injections de LPS qui était différente entre les 2 groupes selon que les injections aient lieux en IP ou en IM. Le LPS était injecté en IM de façon concomitante à la CDTX, le même jour que la BM alors que l'injection de LPS en IP se faisait à partir du 2^{ème} jour post-opératoire puis était répétée à J+4 et J+6. Nous avons fait ce choix car une injection systémique de LPS à la concentration de 1.25 mg/kg au même moment que la BM aurait très probablement été létale bien que non testée. Il est possible que la temporalité de l'inflammation par rapport à la lésion musculaire et BM soit importante pour induire de volumineux OHN. En effet, dans le travail de Genêt et coll. [221], les OHN commencent à être visibles dès J+3 de la BM+CDTX. Les injections de LPS IP à J+2, J+4 et J+6 sont peut-être trop tardives pour avoir une action sur le volume des OHN et ainsi se rapprocher des volumes obtenus avec une dose plus faible de LPS injectée à J+0 en

IM.

Cette expérience permet tout de même de conclure que l'inflammation systémique, est suffisante pour augmenter le volume des OHN. Chez l'homme, il n'existe pas d'inoculation IM directe de LPS ou LTA. Toutefois, une inflammation systémique importante pourrait alors expliquer l'exacerbation du volume des OHN après lésion du SNC. Cette observation est concordante avec les données de la littérature qui retrouvent parmi les facteurs de risque cliniques conduisant à la formation d'OHN, des pathologies participant à augmenter le niveau d'inflammation des patients. Fractures, chirurgies pour fractures, infections pulmonaires et urinaires, passage en réanimation, thrombose veineuse profonde, escarres sont autant de facteurs retrouvés chez les patients développant des OHN et sont également responsables d'une augmentation du niveau d'inflammation systémique.

CHAPITRE 2 : Etudier l'impact de l'injection intramusculaire de toxine botulique sur le volume des OHN dans le modèle murin : hypothèse de la modulation du signal de la JNM, notamment inflammatoire dans la formation des OHN.

L'hypertonie spastique apparaît classiquement dans les suites d'une lésion neurologique centrale. Elle est décrite dans certaines études cliniques comme étant un facteur favorisant la survenue de POAN et par d'autres, c'est le développement de l'ossification ectopique qui est responsable d'une exacerbation de la spasticité.

Cette étude a été pensée initialement pour étudier le rôle de l'hypertonie spastique dans le développement des OHN, indépendamment des autres variables confondantes retrouvées dans les études cliniques rétrospectives. Nous avons utilisé la toxine botulique de type A (BTA), employée en pratique clinique comme traitement focal de l'hypertonie spastique, pour bloquer la jonction neuromusculaire des muscles ischio-jambiers dans le modèle animal spinalisé développant des OHN.

Très vite nous avons été confrontés aux difficultés d'évaluation de l'hypertonie spastique chez les souris (méthodes d'évaluation non validées, petit animal), ce qui nous a conduit à modifier notre hypothèse de départ. Nous avons décidé d'étudier dans ce travail, non pas l'effet de l'hypertonie spastique sur la formation de OHN, mais le blocage de la jonction neuromusculaire par l'utilisation de BTA sur le développement de OHN dans le modèle de souris spinalisées de Genêt et coll. [221].

Un groupe de 13 souris avec BM + CDTX ont reçu une injection de BTA dans la patte arrière droite et du PBS dans la patte arrière gauche, servant de contrôle. De façon surprenante, l'acquisition scannographique a permis de mesurer des OHN 2 fois plus volumineux dans la patte arrière droite injectée de BTA en comparaison aux OHN développés dans la patte arrière gauche. Il semble donc au terme de cette étude que le blocage de la jonction neuro-musculaire par de la BTA localement, au site de développement des OHN permette une augmentation de leur volume. Ces résultats questionnent le rôle de la jonction neuro-musculaire comme modulateur de l'inflammation locale. A l'échelle macroscopique, l'inhibition de l'hyperactivité musculaire (spasticité) pourrait aggraver le développement d'OHN. D'autres études sont toutefois nécessaires pour affirmer ces hypothèses.

ABSTRACT

Objective: To test the role for muscle spasticity in the development of neurogenic heterotopic ossifications (NHO), by blocking neuromuscular signaling with botulinum toxin in a murine model of spinal cord injury-induced NHO.

Design: Basic research

Setting: Stem Cell Biology Laboratory, Cancer Care and Biology Program, Mater Research Institute–The University of Queensland, Woolloongabba, Queensland, Australia

Participants: Spinal Cord Injury (SCI) was performed on 5-6-week-old C57BL/6 inbred mice ($n=13$ per group). Cardiotoxin 0.31mg/kg was injected intramuscularly into the right and left hamstring muscles at the time of the surgery to promote NHO development.

Intervention: Botulinum toxin A (BTA) injections (20 U/kg) were administered at the site of NHO formation in the right hamstrings 4 days prior to SCI, and weekly for 3 weeks to block neuromuscular signaling. An equivalent volume of vehicle was injected in the contralateral site as control.

Main Outcome Measures: Twenty-one days post SCI, quantitative assessment of NHO volume within each hamstrings muscle were performed using Micro-computed tomography scan (μ CTscan).

Results: μ CTscan analysis at day 21 revealed the development of NHO in 100% of mice in both hamstrings with or without BTA. NHO volume average was 1.6 mm³ (\pm 1.0) in the left hamstrings injected with PBS in contrast to 3.3 mm³ (\pm 1.4) in the right hamstrings injected with BTA. This doubling of NHO volume in BTA-treated hamstrings was statistically significant (Wilcoxon matched-pairs signed rank test, $p = 0.013$). Effectiveness of BTA was confirmed by a significant reduction in BTA-injected muscle thickness and mass.

Conclusion: Our murine model of spinal cord injury-induced NHO suggests that local administration of BTA by blocking NMJ at the site of NHO formation exacerbates NHO development leading to an overall increase in bone formation. Our findings question the role of NMJ junction in the modulation of local inflammation but also question the status of muscle overactivity as a causal factor of NHO developing after CNS damage in humans.

Abbreviations: ACh: acetylcholine; BTA: Botulinum Toxin type A; CDTX: cardiotoxin; CNS: Central Nervous System; HO: Heterotopic Ossification; NHO: Neurogenic Heterotopic Ossification; NMJ: neuromuscular junction; PBS: Phosphate-Buffered Saline; PNS: Peripheral Nervous System, SCI: Spinal Cord Injury; siSCI: surgically induced spinal cord injury; TBI: Traumatic Brain Injury; UMN: upper motoneuron

**Blocking neuromuscular junctions with botulinum toxin A injection
enhances neurological heterotopic ossification development after spinal
cord injury in mice**

Marjorie Salga^{a,b,d}, Hsu-Wen Tseng^{d,e}, Kylie A. Alexander^{d,e}, Beulah Jose^d, Cedryck Vaquette^{f,g},
Charlotte Debaud^a, Laure Gatin^{a,c}, François Genêt^{a,b,d,*}, Jean-Pierre Levesque^{d,e,**}

^aEND: ICAP U1179 Inserm, UFR des Sciences de la Santé–Simone Veil, Université Versailles
Saint-Quentin-en-Yvelines, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

^bCIC-IT 1429, Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Hôpital Raymond-Poincaré,
AP–HP, 92380 Garches, France

^cCIC-IT 1429, Department of Orthopedic Surgery, Hôpital Raymond-Poincaré, AP–HP, 92380
Garches, France

^dStem Cell Biology Laboratory, Cancer Care and Biology Program, Mater Research, University of
Queensland, Woolloongabba, Queensland, Australia

^eSchool of Medicine, University of Queensland, Herston, Queensland, Australia

^fCenter in Regenerative Medicine, Institute of health of Biomedical Innovation, Queensland
University of Technology, Kelvin Grove, Queensland, Australia

^gSchool of Dentistry, University of Queensland, Herston, Queensland, Australia

*Corresponding author. Service de Médecine Physique et de Réadaptation, CHU R.-Poincaré, 104,
boulevard R.-Poincaré, 92380 Garches, France

**Co-corresponding author at: Stem Cell Biology Laboratory, Mater Research Institute,
University of Queensland, Translational Research Institute, 37, Kent street, 4102 Queensland,
Woolloongabba, Australia

E-mail addresses: francois.genet@rpc.aphp.fr (F. Genêt), jp.levesque@mater.uq.edu.au (J.-P.
Levesque).

Letter to the editor

Publication in *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 62 (2019) 189–192

Received 16 September 2018

Accepted

6

January

2019

Dear Editor,

Neurogenic heterotopic ossifications (NHOs) are benign ectopic bones that develop within the muscle tissue surrounding extracapsular bone joints [1] after severe lesions of the central nervous system (CNS) such as spinal cord injury (SCI) or traumatic brain injury [2]. NHOs are often diagnosed late, thereby resulting in large ossifications causing joint pain and stiffness that often progress to partial or complete joint ankyloses. Complications such as nerve and blood vessel compression and skin bedsores occur further exacerbate patient morbidity. Occurrence of NHO delays recovery from injury, interrupts rehabilitation programs and lengthens the hospital stay [3]. There is no effective pharmacological treatment to reduce the burden of NHO. Surgical resection of troublesome NHO remains the only treatment and provides some benefit for mobility [3].

Several clinical studies have attempted to identify risk factors associated with NHO to stratify predisposed patients [4]. We do not know whether muscle spasticity is a risk factor [4] or a consequence of ectopic bone growth within the muscle [5]. Botulinum toxin type A (BTA) blocks the a-motor neuron signals mediated by inhibiting the release of acetylcholine (Ach) at the neuromuscular junction (NMJ) within the muscle. Thus, it is currently injected locally in the affected muscle to reduce troublesome spasticity [6]. Identifying specific risk factors such as muscle spasticity from retrospective clinical studies is challenging without additional mechanistic insights into the NHO pathogenesis.

The purpose of this study was to assess the role of NMJ signaling during NHO development by blocking NMJ with BTA in a mouse model of SCI-induced NHO [7].

For CNS trauma-induced NHO, we developed the first mouse model of SCI-induced NHO in non-genetically manipulated mice [7]. In this model, NHO formation requires the combination of both SCI and local muscular damage caused by intramuscular injection of cardiotoxin (CDTX) [7].

Experiments involved female inbred C57BL/6 mice (5–6 weeks old) obtained from the Animal Resource Centre (Perth, Australia). A 100 unit vial of onabotulinum toxin A (BOTOX¹, Allergan Australia) was diluted in 25 mL of 0.9% sodium chloride to obtain a 4 unit/mL stock concentration. To determine the effect of blocking the NMJ on NHO volume, female C57BL6 mice (n = 13) were injected with a first dose of 20 U/kg BTA in the right hamstring muscle

(corresponding to a 80 to 95 uL volume) 4 days before surgery for optimal NMJ blockade on the day of surgery [8,9] (Fig. 1A). Equal volumes of phosphate buffered saline (PBS) were injected in left hamstring muscles as an internal control (right vs. left hamstrings) for each mouse. Mice then underwent surgery for transection of the spinal cord between T11-T13 and intramuscular injection of CDTX from the *Naja pallida* cobra in hamstring muscles of both hind limbs as previously described [10]. BTA and PBS injections in right and left hamstrings, respectively, were continued weekly for the next 3 weeks after surgery [8] (Fig. 1A). The endpoint of the experiment was 25 days after the first BTA intramuscular injection. All mice were assessed for health daily and remained healthy during the whole experiment despite their paraplegia, without adverse events. Mice were housed at a maximum of 5 mice per cage. Water was available in bottles, and food pellets were placed on the bottom of the cage to let paraplegic mice easily access water and food. All experiments were performed after approval of the University of Queensland animal ethics committee following National Health and Medical Research Council recommendations.

To quantify NHO development, both hind limbs of mice underwent micro-CT (micro-CT) on day 21 after SCI + CDTX treatment (Fig. 1B and Table 1) with an Inveon Positron Emission Tomography/CT (PET-CT) multimodality system (Siemens Medical Solutions Inc.). The parameters used for all scans and NHO volume quantification methods are in Supplementary Methods. For muscle mass and thickness, inter- and intra-observer intraclass correlation coefficients were not calculated and quantifications were not blinded. The median NHO volume in muscles treated with BTA was 3.20 mm³ (interquartile range [IQR 2.20–4.45 mm³]), 2.9 fold larger than the median NHO volume in muscles treated with PBS (1.10 mm³ [0.94–2.15 mm³], $P < 0.01$) (Fig. 1B and Table 1). BTA had no effect on mineral density of NHOs (Fig. 1C and Table 1). These data demonstrate that defective ACh signaling in response to BTA injection led to larger NHO

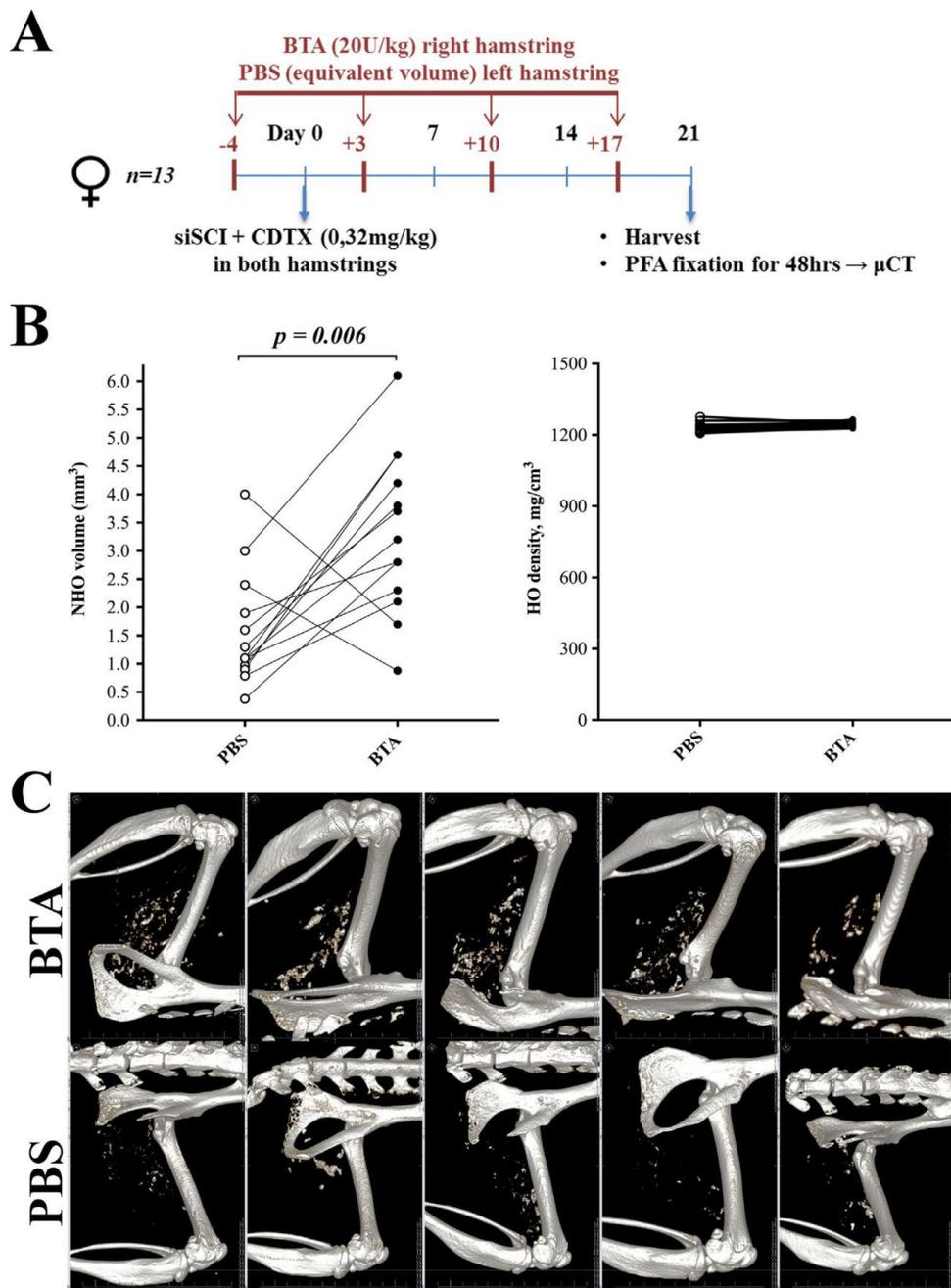


Fig. 1. Neurogenic heterotopic ossification (NHO) volume and mineral density in mouse hind limbs by micro-CT at 21 days after spinal cord injury (SCI) + cardiotoxin (CDTX). A. Injection schedule of botulinum toxin type A (BTA) in the right hamstring muscle and phosphate buffered saline (PBS) in the left hamstring muscle. B. NHO volume (mm^3) was measured by micro-CT in PBS-treated (open circles) and BTA-treated limbs (closed circles). Paired muscles for each individual mouse are joined by a line. C. Mineral density in PBS- and BTA-treated limbs for individual mice. Significance was calculated by paired t test ($n = 13$ mice). D. Representative 3-D reconstructed CT images of NHO at 21 days after surgery. BTA (right hamstring) or PBS (left

hamstring) injections.

Variable	Treatment	No. of mice	Median [IQR]	P-value ^a
NHO volume (mm ³)	BTA	13	3.20 [2.20–4.45]	0.006
	PBS	13	1.10 [0.94–2.15]	
NHO density (mg/cm ³)	BTA	13	1242 [1238–1251]	NS
	PBS	13	1224 [1217–1243]	
Muscle thickness (mm)	BTA	5	1.34 [1.10–1.58]	<0.0001
	PBS	5	2.95 [2.79–3.13]	
Muscle mass (g)	BTA	5	0.59 [0.54–0.61]	0.0001
	PBS	5	0.85 [0.79–0.92]	

Table 1: Assessment of mice with neurological heterotopic ossification (NHO) in limbs treated or not with botulinum toxin A.

IQR, interquartile range; PBS, phosphate buffered saline; NS, not significant

^a By paired t test.

To confirm whether the current regimen of BTA injections can successfully abrogate NMJ signaling and lead to loss of muscle mass [11], we injected a parallel cohort of naïve mice (n = 5) weekly with BTA or PBS in right and left hamstrings following the same treatment regimen but without SCI and CDTX intramuscular injection (Fig. 2A). Hamstring thickness and mass were measured 25 days after the first BTA injection. Right BTA-injected hind limbs showed major and global muscle atrophy as compared with the contralateral side in all mice. The median thickness of hamstrings injected with BTA was 1.34 mm (IQR 1.10–1.58), 2.2 fold lower ($P < 10^{-4}$) than that of contralateral hamstrings injected with PBS (2.95 mm [2.79–3.13]) (Fig. 2B and Table 1). Hamstrings from both sides were collected and their mass was measured (Fig. 2C). Median mass was significantly lower for BTA-injected than PBS-injected hamstring muscles (0.59 g [0.54–0.61] vs. 0.85 g [IQR 0.7– 0.92], $P = 10^{-4}$). Therefore, BTA treatment was effective in reducing hamstring mass and thickness.

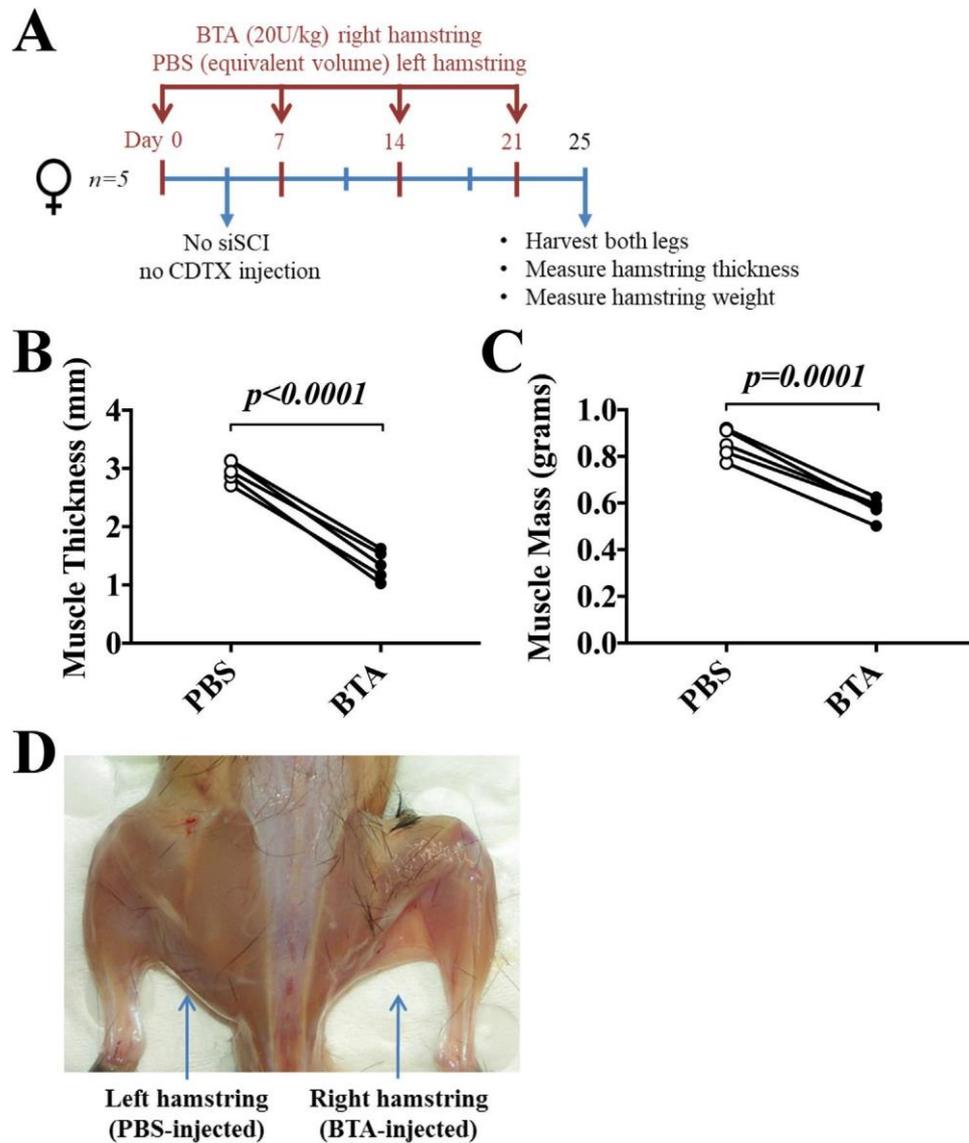


Fig. 2. Effect of BTA injections on muscle thickness and mass. A. Injection schedule of BTA in right hamstring muscle and PBS in left hamstring muscle. B. Thickness and (C) mass of left and right hamstrings at 25 days after the primary injection of BTA or PBS. Paired muscles for each individual mouse are joined by a line. Significance was calculated a paired t test ($n = 5$ mice). D. Anatomical difference between the right (BTA-injected) and left (PBS- injected) hamstrings.

To our knowledge, this is the first report of BTA injection for NMJ blockage on NHO formation. Interfering in NMJ signaling led to enhanced NHO formation in a mouse model of SCI-induced NHO.

Our study has a few limitations. First, we could not assess muscle spasticity in our mouse model before and after BTA injection. Assessment of muscle overactivity in mice is challenging because of small animal size and lower limb joint deformation after paraplegia. Muscle atrophy has been found a common BTA side effect of denervation [11]; we quantified hamstring thickness and mass to assess its efficacy instead of spasticity. We confirmed that BTA induced amyotrophy because the thickness of BTA-injected mouse muscles was reduced by more than 50% and mass was reduced by 30% versus muscles injected with PBS. We do not know whether reducing muscle overactivity directly affected NHO development. Further experiments should be performed, such as injecting BTA in other muscles accessible to clinical assessment (Disease Activity Score response) [8], such as the gastrocnemius muscle. However, BTA is currently used to treat focal muscle overactivity by blocking NMJ in human pathology, so in our model, neurosignaling and subsequent muscle overactivity was abolished by BTA injection. Thus, for reducing muscle overactivity in humans by using BTA, we found major and global muscle atrophy in the right BTA-injected hind limb versus the contralateral side in all mice, which may exacerbate NHO volume.

Second, apart from blocking neuromuscular signaling, BTA has other important biological effects including inflammation, satellite cell activation, oxidative stress, atrophy and metal cation imbalance [12]. Repeated intramuscular BTA treatment causes profound and persistent loss of muscle function and altered muscle structure. Pingel et al. [13] demonstrated that high doses of BTA greatly altered muscle structural composition, and prolonged BTA treatment upregulated the inflammatory cytokines interleukin 6 and transforming growth factor b1 in BTA-treated muscles [13]. Furthermore, BTA activated macrophages dependent on Toll-like receptor 2, thereby leading to enhance secretion of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide and transforming growth factor a. Consequently, structural and immune changes induced by BTA injection may aggravate inflammation and muscle damage induced by CTDx injection in our model, which may further exacerbate NHO formation.

Third, we used a high dose of BTA to maintain the blockage of NMJ during the experiment. Fortuna et al. suggested that most of adverse effects induced by BTA injection into muscle are caused by the primary injection and that multiple injections of BTA do not produce cumulative adverse effects [11]. Therefore, we believe that over-dosage is not a concern in our study.

Furthermore, our BTA treatment protocol, while aggressive, involves injecting BTA once a week according to the work of Aoki et al. [8] in order to maintain efficient blockage of NMJ throughout the experiment. NHO development may occur concomitant with muscle deterioration in fibrosis because NHO requires cell progenitors to develop under inflammatory conditions. Indeed, the mouse model of SCI-induced NHO requires acute muscle damage induced by the injection of CDTX from *N. pallida* snake venom. BTA injection probably increases muscle deterioration and contributes to NHO development.

The characterization of muscle overactivity as a risk factor or a consequence on NHO formation is still ambiguous. Elucidating the exact role of muscle spasticity during NHO formation is challenging in humans, because mainly retrospective and heterogeneous studies have been performed. Therefore, we used the first mouse model of SCI-induced NHO. This model effectively mimics human pathology and provides continuing understanding of NHO pathogenesis [7]. Our study showed that BTA injection in a context of SCI increased NHO size. Although our study is only observational and further mechanistic studies are needed, our findings question the status of muscle overactivity as a causal factor of NHO developing after CNS damage in humans.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Mater Foundation (grant no. 1101620) from the National Health and Medical Research Council of Australia (NHMRC) to JPL, DWH and FG, and by the Assistant Secretary of Defense for Health Affairs through Spinal Cord Injury Research Program (award no. W81XWH-15-1-0606) from the US Department of Defence. JPL was supported by Research Fellowship 1136130 from the NHMRC. The authors also acknowledge the scientific and technical assistance of Dr. Brian Tse from the Translational Research Institute Preclinical Imaging Facility, which is supported by Therapeutic Innovation Australia (TIA). TIA is supported by the Australian Government through the National Collaborative Research Infrastructure Strategy Program. MS was supported in part by ORPEA-CLINEA society and a grant from the Collège Français des Enseignants universitaires de Médecine Physique et de Réadaptation (COFEMER).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at:
<https://doi.org/10.1016/j.amp.2018.09.005>.

References

- [1] Almangour W, et al. Recurrence of heterotopic ossification after removal in patients with traumatic brain injury: a systematic review. *Ann Phys Rehabil Med* 2016;59:263–9.
- [2] Reznik JE, et al. Prevalence and risk-factors of neurogenic heterotopic ossification in traumatic spinal cord and traumatic brain injured patients admitted to specialised units in Australia. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2014;14:19–28.
- [3] Genet F, et al. Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PLoS One* 2011;6:e16632.
- [4] Bargellesi S, et al. Occurrence and predictive factors of heterotopic ossification in severe acquired brain injured patients during rehabilitation stay: cross-sectional survey. *Clin Rehabil* 2018;32:255–62.
- [5] Wharton GW, Morgan TH. Ankylosis in the paralyzed patient. *J Bone Joint Surg Am* 1970;52:105–12.
- [6] Synnot A, et al. Interventions for managing skeletal muscle spasticity following traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;11 [Cd008929].
- [7] Genet F, et al. Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle. *J Pathol* 2015;236:229–40.
- [8] Aoki KR. Preclinical update on BOTOX¹ (botulinum toxin type A) – purified neurotoxin complex relative to other botulinum neurotoxin preparations. *Eur J Neurol* 1999;6:S3–10.
- [9] Warner SE, et al. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* 2006;38:257–64.
- [10] Torossian F, et al. Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI Insight* 2017;2.
- [11] Fortuna R, et al. Changes in contractile properties of muscles receiving repeat injections of botulinum toxin (Botox). *J Biomech* 2011;44:39–44.
- [12] Mukund K, et al. Systems analysis of transcriptional data provides insights into muscle's biological response to botulinum toxin. *Muscle Nerve* 2014;50:744– 58.
- [13] Pingel J, et al. Injection of high dose botulinum-toxin A leads to impaired skeletal muscle function and damage of the fibrillar and non-fibrillar structures. *Sci Rep* 2017;7:14746.

CHAPITRE 3 : Etude de facteurs inflammatoires intervenant dans les processus de formation de POAN à un stade précoce suivant un traumatisme crânien chez l'Homme.

Peu d'études ont étudié les facteurs de risque de POAN à une phase précoce suivant l'atteinte neurologique or la naissance des POAN se fait bien dans les premières semaines, souvent lorsque les patients sont encore en service de soins aigües (chirurgie, réanimation). Par ailleurs, les infections qui apparaissent dans la littérature comme facteurs de risque communs à la survenue de POA et POAN ont été peu détaillées dans les études rétrospectives publiées jusqu'à présent.

En se basant sur les données émanant des expériences fondamentales réalisées dans le chapitre 1 et le chapitre 2, il nous a paru important d'aller rechercher chez l'humain la présence de facteurs inflammatoires locaux et systémiques, et de mieux caractériser l'inflammation spécifique induite par les infections qui pourraient être impliqués dans l'apparition précoce des POAN.

L'étude présentée dans ce chapitre a été conduite chez des patients traumatisés crâniens issus du même service de réanimation chirurgicale polyvalente pour prise en charge aiguë et transférés par la suite dans un centre de soins de suite et de réadaptation identique et spécialisé en rééducation neurologique. Pour chaque patient, nous avons effectué un travail rétrospectif de recherche de données dans les dossiers de réanimation concernant les caractéristiques infectieuses et les pathologies source d'inflammation. Les patients avec POAN (les « cas ») ont ensuite été comparés aux patients sans POAN (les « témoins »).

L'article suivant est en cours de révision dans la revue Journal Of Head Trauma Rehabilitation.

Traumatism brain injury: if neurological damage was not the key to the development of neurogenic heterotopic ossification?

Salga Marjorie^{1,2}, Gatin Laure³, Debaud Charlotte¹, Paquereau Julie², Dihn Auérlien⁴, Genêt Guillaume, Kerever Sébastien, Abback Paer-Sélim⁵, Paugam Catherine^{5,6}, Levesque Jean-Pierre^{7,8}, Genêt François^{1,2}

¹ University of Versailles Saint Quentin en Yvelines, END:ICAP U1179 INSERM, UFR des Sciences de la Santé-Simone Veil, Montigny le Bretonneux, France

² Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Raymond Poincaré Hospital, APHP, CIC-IT 1429, Garches, France

³ Department of Orthopedic surgery, Raymond Poincaré Hospital, APHP, CIC-IT 1429, Garches, France

⁴ Department of Infectious Disease, Raymond Poincaré Hospital, APHP, CIC-IT 1429, Garches, France

⁵ Department of Intensive Care Unit, Beaujon Hospital, Clichy, France

⁶ University of Paris VII Denis-Diderot, Paris, France

⁷ Stem Cell Biology Laboratory, Cancer Care and Biology Program, Mater Research - The University of Queensland, Woolloongabba, Queensland, Australia

⁸ School of Medicine, The University of Queensland, Herston, Queensland, Australia

Corresponding author :

Dr Marjorie Salga

Service de Médecine Physique et de Réadaptation

CHU Raymond Poincaré

104 Boulevard Raymond Poincaré

92380 Garches, France

Tel : +33 1.47.10.70.82

Fax +33 1.47.10.70.73

Mail : marjorie.salga@aphp.fr

Abstract

Traumatism brain injury (TBI) remains a main cause of mortality. Throughout life, survivors have to confront numerous deficiencies that impact functional recovery and quality of life. Neurogenic heterotopic ossification (NHO) is a complication that may occur after TBI and further increases patient's disability. Previous studies identified infection as a risk factor for NHO apparition but none of them describe infectious settings at an early stage after TBI in intensive care unit (ICU). The purpose of this study was to confirm the relationship between inflammation level including infection acquired during ICU stay after TBI and precocious development of NHO and better precise inflammation and infectious features.

Patients enrolled in this study were admitted successively in the same ICU and then rehabilitation service for TBI, between January 2016 and June 2018. A case control design was used to compare case patient (with troublesome NHO) with control patients (without NHO). Data related to infections features acquired in ICU were collected from patients' medical file.

A total of 70 TBI patients were admitted in both services. From this cohort, 6 patients developed NHO (8,6%). Sepsis-related infections, specially pneumonia, and urinary tract infections occurred more frequently in cases compared to controls but the difference was only significant for urinary infections ($p=0.034$). Infections with Gram Negative Bacilli bacteria or *Pseudomonas aeruginosa* were more common in patients with NHO ($p=0.0004$). However, Gram Positive Cocci bacteria and polymicrobial infections occurred as frequently in cases as controls. The frequency of septic shock was comparable between the two groups like the delay from TBI to the first infection in ICU. Patients with NHO were presenting more often associated trauma with a high injury severity score and required surgery compared to patients without NHO ($p=0.007$ and $p=0.038$, respectively). Long mechanical ventilation, long oro-tracheal intubation and tracheotomy were more frequent in the group cases compared to the control group ($p=0.001$; $p=0.0009$ and $p=0.01$, respectively). Duration of stay in ICU and coma were also longer in patient with NHO ($p=0.048$ and $p=0.009$, respectively). Both groups were similar regarding neurological variables.

We speculate that while others risk factors may be involved in NHO formation, our results suggest that BGN infections acquired during ICU stays are highly associated with the development to NHO after TBI. At equal neurological severity, patients seem to have a higher risk to develop NHO when they combine factor providing a high level of inflammation.

Key words: neurogenic heterotopic ossification, traumatic brain Injury, osteogenesis, neuro-orthopedic complication

Abbreviations: CNS: Central nervous system; GNB: Gram Negative Bacillus; GPC: Gram Positive Cocci, HO: Heterotopic Ossification; ICU: Intensive Care Unit; ISS: injury severity score; MV: mechanical ventilation; NHO: Neurogenic Heterotopic Ossification; SCI: Spinal Cord Injury; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; TBI: Traumatic Brain Injury

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a main cause of premature death and disability. The incidence is estimated at 500/100,000 per year in the USA and Europe [1,2]. Severe TBI usually occur synonymous with polytrauma involving multiple organs [1] and emergency surgical interventions are often required to stabilize patients sustaining such injuries. This leads to prolonged stays in intensive care unit (ICU) but also longer durations of mechanical ventilation (MV) [3]. Inevitably, the duration of recovery is increased so as the incidence of in-hospital complications, particularly nosocomial lung infection due to prolonged MV [4].

Brain-injured patients surviving the initial polytrauma approximated around 57 million in the world [5]. During time in intensive care, they experience morbidity due to concomitant motor, sensory, cognitive and behavior impairments, which negatively impact their health and quality of life [6]. Morbidity of TBI may be further exacerbated by neuro-orthopedic complications, including the development of neurogenic heterotopic ossifications (NHO) [7].

This condition leads to severe joint pain and reduced joint mobility due to ectopic mature lamellar bone formation in the soft tissues surrounding extracapsular joints. NHO occurs in 5-20% of patients with TBI but can appear in other neurogenic conditions, such as traumatic spinal cord injury (SCI) (20-29%), stroke, cerebral anoxia and encephalitis [8-11]. Heterotopic ossification also develops in inflammatory contexts mostly after burn [12], amputation [13], and long stay in intensive care unit (pancreatitis, Guillain Barre Syndrome) [14,15]. The most common location is the hip but other joints can also be involved such as knee, elbow and shoulder [16]. Bone growth during the year following the trauma can lead to joint ankyloses, nerve and vessels compression or bedsores, which further hamper functional recovery [17]. NHO development might interfere with the rehabilitation program and thus delay potential neurological recovery. From their first description in 1883 by Riedel et al. and in 1918 on paraplegic soldiers by Dejerine and Ceillier [7,18] the only curative treatment remains surgical resection [8,19].

The pathophysiology of NHO is still not clear, but several risk factors have been identified to be

associated with ectopic bone formation after TBI. Findings in regard to injury severity, mechanical ventilation, tracheotomy, autonomic dysregulation, spasticity, coexisting fracture and orthopedic surgery have been debated [17,20–22]. Most of prior clinical reports about NHO are retrospective, conducted during the chronic stage after TBI, and thus are complicated by numerous confounding factors. Systemic infection is one of many risk factors leading to NHO development [9,23], and appear to be consistent in the different etiologies (burn, amputation, stroke, SCI, long stay in ICU) leading to ectopic bone formation [13,23–26]. However, the importance of infections occurring directly after the accident and its role in HO formation seems to be underestimated. No specific details are given in the literature in terms of bacteria species, infection severity or frequency of sepsis during hospital stay. More broadly, inflammation appears to be important in ectopic bone development in acquired neurogenic and non-neurogenic HO [23,27]. As highlighted by fundamental research, inflammatory pathways, macrophages and cytokines are essential to HO creation [13,28,29]. Inflammation is present after head trauma and increases in a context of polytrauma [30]. Logically, its magnitude depends on the severity of the trauma. Causes of systemic and local inflammation after initial trauma and during intensive care can be multiple and infection is one of them. While the priority in ICU is to deal with life threatening, processes leading to NHO are probably early activated due to the presence of combined risk factors [17,20,21]. It is essential to clarify the role of systemic infection and inflammatory features experienced by patients who develop NHO, during the early stage of development that occur during intensive care.

The purpose of this study was to better understand the relationships between infection states of TBI patients acquired during intensive care, and the initiation of NHO development, which occurs at this time. Our secondary objective was to precise inflammatory factors due to polytrauma and ICU stay involved in precocious development of NHO.

Material and method

- Participants

Patients enrolled in this study were admitted for TBI in the same ICU of a tertiary care Hospital for vital care between January 2016 to June 2018. All TBI patients were recorded in “Head Injury Database”. Following the acute phase, TBI patients who required rehabilitation were then admitted to a neurorehabilitation center. We selected only patients who went to a specific hospital. Patients settings were reported in “Medical Database” of neurorehabilitation center. The cohort of patients was determined by crossing “Head Injury Database” and “Medical Database mentioning TBI” to obtain patients who went in both hospitals after TBI. We differentiate TBI patients with and without NHO by crossing the precedent result of “TBI

patients who went in both hospitals” with “Medical Database mentioning NHO”. All the patients with troublesome NHO had a surgical excision by the same surgeon in the orthopedic department. Patients were excluded if they developed a NHO before the TBI.

A case control design was used for this study, following guidelines for epidemiological studies [31] and because of the few cases of TBI-related NHO in this specific population. Each case patient (with troublesome NHO) was matched with six control patients (without NHO) for sex and age. Case and control patients had been treated equally in the same ICU department and then, the same head injury rehabilitation center.

- Outcome measures

Medical records which contained complete details of the patient’s medical history were compared in order to i) confirm and precise the relationship between infection and NHO at an early stage after TBI in a context of polytrauma and ii) define precocious inflammatory factors (circumstances of the accident, neurological and respiratory state, drugs used, associated trauma) involved in NHO development.

- Data collection

The data were obtained via the Medical Database of ICU department and “Head Injury Database” database.

We listed for each patient, the age at the time of the accident, the gender and the Body Mass Index (BMI).

The following data related to infections in ICU were recorded for each patient: infection location (pulmonary, urinary, cutaneous, abdominal), number of sepsis-related infection [32] and septic shock [33] during ICU stay, bacteria family (Gram negative, Gram positive, non-documented) and individual bacteria for each infection, polymicrobial infections and delay from TBI to the first infection.

Inflammatory factors were also recorded: duration of stay in ICU, duration of coma, circumstances of the accident (TBI etiology, velocity, crush-projection of the body during the accident, extraction of the patient from a vehicle, presence of alcohol in the first blood test), neurological and respiratory state, drugs used, associated trauma.

Neurological state after TBI was investigated using: the first Glasgow Coma score recorded, intracranial lesions on the first CT-scan, increase in intracranial pressure > 25 mmHg, associated traumatic spinal cord injury, motor and cognitive disorder (time and space orientation) at patient’s discharge from ICU.

Respiratory state was defined by the duration of oro-tracheal intubation, duration of mechanical ventilation, implantation of tracheotomy and acute respiratory distress syndrome. Information

about patient drug treatments was recorded, including the types of drugs used, the duration of the prescription, and the dose administered.

Associated trauma were also recorded, including the number of bone fractures, number of surgeries for bone fracture, number of chest-pelvis-abdominal traumas sustained and surgery or drain implantation for chest-pelvis-abdominal trauma, craniectomy, craniotomy, extracranial cerebrospinal fluid derivation, and injury severity score (ISS) [34].

The Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score was calculated to evaluate the degree of organ dysfunction in the patients studied [35]. Other complications previously related to NHO were also collected such as bedsores and deep venous thrombosis.

- Statistical analysis

Quantitative data are reported in median and inter-quartile range [IQR]. Qualitative data are presented as occurrences within the cohort (n) and frequency in percentage (%). Univariate comparisons of quantitative and qualitative covariates with NHO were examined by Wilcoxon test and Fisher's exact test, respectively. Statistical significance was defined at the conventional 5% level ($p < 0.05$). All computations were performed using the software open-source R version 3.0.2 (2013-09-25) and LATEX on a platform i386-w64-mingw32.

- Ethic consideration

As this retrospective study was non-interventional with usual procedures and without additional interventions, patient's consent was not needed. The authors confirm that the named institutional review board specifically waived the need for consent for this study [Comité de Protection des Personnes, Ile de France XI, Pavillon Jacques Courtois – 2ème étage 20, rue Armagis 78105 Saint Germain en Laye Cedex. Tel: 0139274258. Fax: 0139274901. Email: cppidf11@chi-poissy-st-germain.fr]. According to the law from the 6th of January 1978 modified in 2004, the present work has been declared to the French National Agency regulating Data Protection, CNIL under the number 2212374 v 0.

Results

To study the role of infection and inflammation at an early stage after a TBI in NHO development, we compared patients case data with reported NHO with patients without NHO. A total of 70 TBI patients were admitted first to the same ICU and neurorehabilitation department. From this cohort, 6 patients developed NHO (8,6%).

- Populations (table 1)

Case series: Of the 6 patients who developed NHO, 5 were males, gender ratio: 83,3%. Mean age

at time of the TBI was 22 [20 ;29] years old. Injuries sustained by one patient involved a complete traumatic spinal cord injury. NHO were located around the hip for 3 patients and at the inner part of the knee for 3 other patients. Diagnosis of NHO was clinically suspected in attendance of joint pain, limitation of range of motion, inflammatory symptoms and confirmed by an imaging (X-ray or CT-scan).

Control series: Sixty-four patients sustained TBI, while not developing NHO (53 males, gender ratio: 82,1%). Mean age at the time of TBI was 29 [22 ;40] years old.

No difference was found between case and control groups in term of age, gender and body mass index (BMI). Both groups had a similar medical history regarding percentage of active smoker, auto-immune disease and addiction to alcohol and cannabis.

The duration of stay in ICU was significantly prolonged in patient with NHO (31 days [27 ;46]) compared to patients without NHO (17 days [9 ;29]) ($p=0,048$). The duration of coma was twice longer in the population with NHO in contrast to patients without NHO ($p=0,009$).

Regarding the etiologies of TBI (Table 1) in the group of patients with NHO, 4 patients (66.7%) sustained TBI during vehicle accidents, and 2 others by falling. TBI occurred after vehicle accidents for 30 patients without NHO. Eight patients from the control group were pedestrians and the remaining 12 had fallen from a height. For 14 patients, another cause was responsible for the TBI. We found no difference between cases and controls in term of high velocity of the trauma, crush-projection of the body during the accident, and presence of alcohol in the first blood test.

Table 1. Relationship between NHO occurrence and patient's characteristics in ICU and circumstances of head trauma analyzed in univariate analysis.

Variables	Controls (n=64)	Cases (n=6)	p-value
Gender ratio, n (%)	53 males (82,1 %)	5 males (83,3 %)	1
Age (years), median [IQR]	29 [22 ;40]	22 [20 ;29]	0.30
Body mass index (kg/m²), median [IQR]	23 [21 ;26]	25 [23 ;26]	0.31
Active smoker, n (%)	24 (37.5 %)	2 (33.4 %)	1
Auto-immune disease, n (%)	3 (4.7 %)	0 (0%)	1
Addiction (alcohol, cannabis)	13 (20.31 %)	2 (33.4 %)	0.6
Duration of stay in ICU (days), median [IQR]	17 [9 ;29]	31 [27 ;46]	0.048
Duration of coma (days), median [IQR]	9 [2 ;15]	23 [14 ;28]	0.009
Causes of TBI, n (% patient)			0.91
- Four-wheel vehicle accident	11 (17.4 %)	0 (0 %)	
- Two-wheel vehicle accident	19 (30.1 %)	3 (50 %)	
- Pedestrian	8 (12.6 %)	1 (16.7 %)	

- Falls	12 (19.1 %)	2 (33.3 %)	
- Other	14 (21.8 %)	0 (0 %)	
High velocity of the trauma, n (%)	28 (66.7 %)	3 (75 %)	1
Crush-projection of the body during the accident, n (%)	16 (35.6 %)	4 (80 %)	0.14
Presence of alcohol in the first blood test, n (%)	14 (22.6 %)	1 (16.7 %)	1

Patients who developed NHO all presented sepsis-related infections during ICU hospitalization, compared to controls (Table 2). Although, statistical difference between both groups was not significant ($p=0.18$). Interestingly, urinary tract infections occurred more frequently in cases involving the development of NHO ($p=0.034$). Pneumonia acquired under mechanical ventilation happened in all patients with NHO but no statistical difference was detected compared to the control group. Even though, statistical analysis found no difference between case and control groups ($p=0.075$), infections with Gram negative bacilli (GNB) were diagnosed in 100 % of patients who developed NHO versus 57.8 % of patients without NHO. *Pseudomonas aeruginosa* were more commonly associated with NHO-developing patients than patients that did not develop NHO ($p=0.034$). However, enterobacter species and others GNB infections occurred as frequently in cases as controls, as well as GPC bacteria, and polymicrobial infections. The frequency of septic shock was comparable between the two groups like the delay from TBI to the first infection in ICU. These data demonstrated a correlation between the development of NHO and septic infection during intensive care, and further identify specific bacterial agents associated with the formation of NHO.

Table 2. Relationship between NHO occurrence and infection variables.

Variables	Controls (n=64)	Cases (n=6)	p-value
Patients with sepsis related to infection, n (%)	45 (70.3 %)	6 (100 %)	0.18
Patients with septic shock, n (%)	2 (3.1 %)	1 (16.7 %)	0.24
Patients with pneumonia, n (%)	44 (68.8 %)	6 (100 %)	0.17
Urinary tract infection, n (%)	2 (3.1 %)	2 (33.3 %)	0.034
GNB infection, n (%)	37 (57.8 %)	6 (100 %)	0.075
- Enterobacter species	28 (43.8 %)	4 (66.7 %)	0.4
- Pseudomonas species	7 (11.0 %)	5 (83.3 %)	0.0004
- Others GNB	24 (37.5 %)	2 (33.3 %)	1
GPC infection, n (%)	32 (50 %)	3 (50 %)	1
Polymicrobial infection, n (%)	36 (80 %)	6 (100%)	0.57
Delay from accident to the first infection (days), median [IQR]	5 [3 ;6]	4.5 [2.5 ;5.8]	0.64
SOFA score, median [IQR]	8 [4 ;10]	9.5 [9 ;11]	0.14

GNB: Gram Negative Bacillus, GPC: Gram Positive Cocci, Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score, min 0—max 24

Associated traumas (Table 3), including bone fracture and chest-pelvis-abdominal traumas,

were more frequent in the group with NHO (66.7 % and 83.3 %, respectively) than in the group without NHO (46.9 % and 53.1 %, respectively) but statistical analysis found no difference. In contrast, total ISS was 13 points higher in patients with NHO formation in comparison with patients with no NHO ($p=0,007$). Regarding to ISS sub-groups, ISS head-neck and ISS abdomen-pelvis were particularly greater in NHO group compared to the group of patients without NHO ($p=0,031$ and $p=0.012$, respectively). Surgeries or drain implantations for an associated trauma were significantly more frequent in patients who developed NHO compared to patients who did not develop NHO ($p=0,038$). Sub-group analyses found similar differences between the two groups in term of surgery treatment for bone fracture ($p=0,006$) and chest-pelvis-abdominal trauma ($p=0,05$). These results indicated that surgeries, drain implantations and ISS after TBI are correlated to NHO formation.

Table 3. Relationship between NHO occurrence and inflammation variables analyzed in univariate analysis.

Themes	Variables	Cases (n=6)	Controls (n=36)	p-value
Associated traumas	Bone fracture, n (%)	30 (46.9 %)	4 (66.7 %)	0.42
	ISS total, median [IQR]	25 [17 ;33]	38 [35 ;42]	0.007
	- Head-neck	4 [3 ;5]	5 [5 ;5]	0.031
	- Face	0 [0 ;1]	0 [0 ;0]	0.081
	- Chest	2 [0 ;3]	2.5 [0.5 ;3]	0.49
	- Pelvis-abdomen	0 [0 ;0]	2 [0.5 ;2.8]	0.012
	- Limbs	0 [0 ;2]	2 [2 ;2.8]	0.074
	Surgery or drain implantation total, n (%)	35 (54.7 %)	6 (100 %)	0.038
- Bone fracture	15 (23.4 %)	5 (83.3 %)	0.006	
- Chest-pelvis-abdominal trauma	9 (14.1 %)	3 (50 %)	0.05	
- Craniectomy, craniotomy and extracranial derivation	22 (34.4 %)	4 (66.7 %)	0.19	
Neurology	Glasgow Coma scale, median [IQR]	7.5 [4.8 ;12]	6 [4.5 ;6.8]	0.25
	Focal intracranial lesions on first CT-scan, n (%)	51 (79.7 %)	4 (66.7 %)	0.6
	Diffuse intracranial lesions on first CT-scan, n (%)	55 (85.9 %)	6 (100 %)	1
	Intracranial hypertension > 25 mmHg, n (%)	25 (47.2 %)	4 (66.7 %)	0.42
	Cognitive disorder at discharge from ICU, n (%)	52 (81.3 %)	6 (100 %)	0.58
	Motor deficiency at discharge from ICU, n (% patient)	24 (37.5 %)	4 (66.7 %)	0.21
Respiratory	Duration of oro-tracheal intubation (days), median [IQR]	15 [10 ;20]	36 [24 ;54]	0.0009
	Duration of mechanic ventilation (days), median [IQR]	15 [10 ;22]	32 [26 ;54]	0.001
	Implantation of tracheotomy, n (%)	17 (26.6 %)	5 (83.3 %)	0.01
	Acute respiratory distress syndrome,	16 (27.6 %)	4 (66.7 %)	0.071

	<i>n</i> (%)			
Drugs	Medications for sedation , median [IQR]	2 [2 ;3]	3.5 [2.2 ;4]	<i>0.13</i>
	Length of sedation (days), median [IQR]	6 [2 ;12]	7.5 [4.5 ;19]	<i>0.19</i>
	Use of curare > 24h , <i>n</i> (%)	16 (25 %)	3 (50 %)	<i>0.33</i>
	Use of vasoplegic drugs > 24h , <i>n</i> (%)	45 (70.3 %)	6 (100 %)	<i>0.18</i>
	Use of corticoids , <i>n</i> (%)	13 (21.0 %)	1 (20 %)	<i>1</i>
Complications	Bedsore s, <i>n</i> (% patient)	5 (7.8 %)	0 (0 %)	<i>1</i>
	Vein thrombosis , <i>n</i> (% patient)	5 (7.8 %)	2 (33.3 %)	<i>0.11</i>

ISS: Injury Severity Score, min 0—max 75

Even though Glasgow Coma score was lower in the group with NHO (6 [4.5 ;6.8]) compared to the group without NHO (7.5 [4.8 ;12]), no statistical difference was found between cases and controls (Table 3). Motor and cognitive deficiency were more frequent in population who developed NHO (66.7 % and 100 %, respectively) in contrast with patients who did not develop NHO (37.5 % and 81.3%, respectively). Moreover, intracranial hypertension > 25 mmHg occurred in 66.7 % of the cases and 47.2 % in the control. For all neurogenic variables, we found no significant difference between the two groups of patients. Our results suggested that both populations are quite similar in terms of neurological presentation and variables related did not seem to impact NHO development.

Oro-tracheal extubation was performed ~2 times later on patient who developed NHO in contrast with patient who had no NHO ($p=0,0009$) (Table 3). The need in mechanical ventilator support was longer for patients with NHO (32 days [26 ;54]) in comparison with patients without NHO (15 days [10 ;22]) ($p=0,001$). We found a higher incidence of tracheotomy in the group that develop NHO compared to the group which did not develop NHO ($p=0,01$). Although, acute respiratory distress syndrome was twice more frequent in cases compared to controls, the difference between both groups was not significant.

Medications and duration of sedation were comparable between the two groups. Interestingly, curare and vasoplegic drugs were more prescribed in population of patients with NHO (50 % and 100 %, respectively) in comparison with population of patients without NHO (70.3 % and 25 %, respectively). In contrast, corticoids were prescribed in the same proportion in both groups. None of these differences were significant.

Herein, we found no difference between the 2 groups of patients in terms of SOFA score, bedsore and deep vein thrombosis.

Discussion

To our knowledge, this is the first report studying infection and inflammation features on NHO development at an early time after TBI. We provided evidence that GNB infections and more specifically *P. aeruginosa* leads to NHO formation. We also showed that NHO is correlated with a

high level of inflammation regardless of head trauma severity.

Acute TBI initiates an inflammatory response syndrome, directly [36]. The inflammatory mediators interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha are responsible for acute inflammation that often self-propagates and causes tissue damage leading to further inflammation and damage [36]. Furthermore, Huang et al. reported that inflammatory mediators are involved in the differentiation of resident mesenchymal stem cells into bone cells, present in skeletal muscle, and creates a local and systemic inflammatory environment necessary for NHO development [27]. Thus, it is logical to postulate that inflammation response syndrome could be a major driver of NHO initiation or growth after TBI. If CNS damage increase inflammation level, it is not sufficient for HO development. In our study, none of the neurological variables collected were associated with NHO occurrence. A higher level of inflammation is needed to initiate NHO. Like for HO encounter in non-neurogenic pathologies (burns, amputation, Guillain Barre, long stay in ICU), surgeries, associated trauma and infections are required to produce more inflammation. We hypothesize that NHO needs a certain inflammatory threshold to induce ossification of muscle progenitor cells.

Admission in ICU is often required for vital care after severe TBI [1,2]. Patients with severe TBI usually present associated trauma and necessitate emergency surgical interventions [1]. Altogether leads to prolonged stays in ICU, longer durations of oro-tracheal intubation, MV and long coma by sedation [3]. These factors have also been identified in the literature as risk factors in NHO development, as well as in our study [9,21,23,37]. However, we believe that these variables are linked with the severity of the patient and may be falsely correlated with NHO formation. Patients with severe brain injury have been identified as high risk to develop ventilator-associated pneumonia due to prolonged MV which is likely linked to hospitalization duration [38,39]. In patients with prolonged intubation, tracheotomy is recommended to decrease the risk to develop ventilator-associated pneumonia so tracheotomy is logically associated with prolonged mechanical ventilation [40]. Simonsen et al. identified total length of stay in hospital as a risk factor related to NHO with univariate statistical analysis but not after a logistic regression analysis [41]. Similarly, for Reznik et al., the length of stay in hospital was significantly higher for patients with NHO based on univariate analysis but not after multivariate analysis; however duration of oro-tracheal intubation was significant after both univariate and multivariate statistical analysis.⁹ Thus, interpretation of the correlation between prolonged intubation, MV, coma, ICU stay and NHO occurrence have to be cautious as most of these variables could be consider as confounding factors because they are linked to each other and depends on other factors.

Severe TBI usually occur synonymous with polytrauma involving multiple organs, and emergency surgical interventions are often required to stabilize patients sustaining such injuries [1]. Like in our study, multiple injuries and a high ISS have were strongly correlated with presence of NHO [9,23,41]. Limbs trauma have been more specifically studied in the literature and numerous authors found an increase of bone fracture in patients with NHO [20,42]. Patients seem to present a higher risk of NHO when the number of bone fractures increase and when a surgical treatment is required [20,42]. In the present study, both groups, with and without NHO, were similar in terms of bone fracture and ISS limb did not significantly differ. However, surgery for bone fracture as well as chest-pelvis-abdominal trauma were associated with NHO development. To our knowledge, this is the first study reporting a link between total number of surgery or drain implantation per patient during ICU hospitalization and NHO formation.

Infections are quite frequent in patients after central nervous system (CNS) lesion for several reasons [43]. Neurological damage induces immunology deficiency of both innate and adaptive immune system [38,44,45]. Infections also depend on the cause of neurological lesion. SCI causes bladder dysfunction and low exhale pressure that often leads to urinary tract infection and pneumonia [46], while TBI can be responsible for swallow deficiency and may cause lung infections. On the top of that, patients hospitalized in ICU for vital care after CNS damage are more likely to develop infections, specially patients with severe brain injury (Glasgow coma score < 8) [38,47]. Infections and more specifically pneumonia and urinary tract infections have been reported in the literature as risk factors of NHO development after SCI [23] and TBI [9,48]. In the present study, we also found a higher incidence of urinary tract infection in the population of patients who develop NHO. Although, pneumonia occurrence was not significantly different between the groups with and without NHO, 100% of patients who develop NHO presented at least one pneumonia during they stay in ICU. The number of sepsis-related to infection during ICU stay was not correlated with NHO occurrence but all the patient with NHO had one or more infection. According to the literature, infections and more specifically urinary tract infections seem to support NHO development.

Pseudomonas species with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were classified as the most common bacteria inducing infections in ICU. From all these species, *Pseudomonas species* are the only microorganisms independently associated with increased mortality rates [35]. Indeed, development of sepsis related to infection has been described to significantly increase the risk of physical disability, permanent organ damage, cognitive disorder and death [38,49]. Regarding bacteria species in our population of patients, we noticed that GNB and particularly *P.*

aeruginosa causing infections were more frequent in patients with NHO. In contrast Gram positive cocci and polymicrobial infections were similar in both groups with and without NHO. Therefore, *P. aeruginosa* appears to increase mortality rate in the literature and also participates to NHO occurrence in our study.

Curare and diazepam have been described as iatrogenic risk factors of NHO, by inducing paralysis and muscle atonia [24,50,51]. Curare is broadly administrated in ICU during ARDS to induce a paralysis of respiratory muscles and assure lung protection, when diazepam provide sedation needed to prevent secondary brain insults of systemic origin [52]. In the current work, we did not find any correlation between drugs commonly used in ICU, the dose administrated, duration of the treatment and NHO occurrence. Curare presented as a risk factor of HO occurrence might actually be a confounding factor because directly linked with ARDS, lung infection in ICU and surgery. In here, we found no consistent evidence between drugs administrated in ICU and NHO formation.

The current study has few limitations. It must be noticed that one patient with NHO had an initial Glasgow coma score of 12, cranial fracture with intracranial diffuse and focal lesions but also a complete paraplegia due to a traumatic SCI. This patient got a neurological aggravation with an increase of intracranial pressure leading to cerebrospinal liquid derivation and secondary, to surgical evacuation of hematoma. Consequently, we considered this patient as a severe TBI.

The data have been collected retrospectively. Fortunately, patient charts in ICU are very standardized and allow us to collect all information needed for our study with a low percentage of missing data.

The number of TBI-related NHO was relatively small. We explain the small number of the cohort by the restrictive selection of the population. Patients involved in this study have been to the same ICU and then, the same neuro-rehabilitation department. The population is very homogenous which reduces recruitment bias due to ICU care practice, but the small amount of patients (N=6) may limit the statistical analysis power and the possibility to perform a multivariate analysis. However, NHO is a rare complication and a high number of control patients (N=64) is likely to have limited this bias. Therefore, the results presented in our study should be generalized to the TBI population admitted in ICU in a context of polytrauma.

Currently, the majority of human studies are retrospective and heterogeneous including numerous confounding factors. Moreover, early data when NHO starts to develop after central nervous system damage are missing. In order to enhance our understanding of NHO, we plan to conduce a large prospective study on TBI and SCI patients from their admission in intensive care (ICU or orthopedic service) until one year after the trauma. Clinical data and biological samples

will be collected to form a clinical and biological database called “BENTHOS”. Thus, findings from the present retrospective study will be confirmed taking into account confounding variables.

Conclusions

The development of NHO in patients with TBI is likely to have a multifactorial risk factors. We reported for the first time that GNB infections and more specifically due to Pseudomonas species are involved in NHO formation. In addition, we provided evidence that surgery for chest-pelvis-abdominal trauma and bone fractures is related to NHO occurrence. Every single infection, surgery, trauma occurring after TBI, seem to increase inflammation level required for NHO formation. Further studies with more patients are needed to confirm our results. A prospective design could improve methodology, help to recruit more cases and decrease bias.

Acknowledgments

This work was supported in part by

Author Disclosure Statement.

No competing financial interests exist.

References

1. Maas, A.I.R., Stocchetti, N., and Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 7, 728–741.
2. Alali, A.S., Burton, K., Fowler, R.A., Naimark, D.M.J., Scales, D.C., Mainprize, T.G., and Nathens, A.B. (2015). Economic Evaluations in the Diagnosis and Management of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Analysis of Quality. *Value Health J. Int. Soc. Pharmacoeconomics Outcomes Res.* 18, 721–734.
3. Corrigan, J.D., Selassie, A.W., and Orman, J.A.L. (2010). The epidemiology of traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 25, 72–80.
4. Bronchard, R., Albaladejo, P., Brezac, G., Geffroy, A., Seince, P.-F., Morris, W., Branger, C., and Marty, J. (2004). Early onset pneumonia: risk factors and consequences in head trauma patients. *Anesthesiology* 100, 234–239.
5. Langlois, J.A., Rutland-Brown, W., and Wald, M.M. (2006). The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J. Head Trauma Rehabil.* 21, 375–378.
6. Berger-Estilita, J., Granja, C., Gonçalves, H., Dias, C.C., Aragão, I., Costa-Pereira, A., and Orwelius, L. (2019). A new global health outcome score after trauma (GHOST) for disability, cognitive impairment, and health-related quality of life: data from a prospective cross-sectional observational study. *Brain Inj.* , 1–10.
7. Vanden Bossche, L., and Vanderstraeten, G. (2005). Heterotopic ossification: a review. *J. Rehabil. Med.* 37, 129–136.
8. Aubut, J.-A.L., Mehta, S., Cullen, N., Teasell, R.W., ERABI Group, and Scire Research Team. (2011). A comparison of heterotopic ossification treatment within the traumatic brain and spinal cord injured population: An evidence based systematic review. *NeuroRehabilitation* 28, 151–160.
9. Reznik, J.E., Biros, E., Marshall, R., Jelbart, M., Milanese, S., Gordon, S., and Galea, M.P. (2014). Prevalence and risk-factors of neurogenic heterotopic ossification in traumatic spinal cord and traumatic brain injured patients admitted to specialised units in Australia. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 14, 19–28.
10. Chua, K.S.G., and Kong, K.H. (2003). Acquired heterotopic ossification in the settings of cerebral anoxia and alternative therapy: two cases. *Brain Inj.* 17, 535–544.
11. Zhang, X., Jie, S., Liu, T., and Zhang, X. (2014). Acquired heterotopic ossification in hips and knees following encephalitis: case report and literature review. *BMC Surg.* 14, 74.
12. Chen, H.-C., Yang, J.-Y., Chuang, S.-S., Huang, C.-Y., and Yang, S.-Y. (2009). Heterotopic ossification in burns: our experience and literature reviews. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 35, 857–862.
13. Edwards, D.S., and Clasper, J.C. (2015). Heterotopic ossification: a systematic review. *J. R.*

Army Med. Corps 161, 315–321.

14. Jacobs, J.W., De Sonnaville, P.B., Hulsmans, H.M., van Rinsum, A.C., and Bijlsma, J.W. (1999). Polyarticular heterotopic ossification complicating critical illness. *Rheumatology (Oxford)* 38, 1145–1149.
15. Vaishya, R., Agarwal, A.K., Vijay, V., and Vaish, A. (2016). Heterotopic Ossification Circumferentia Articularis (HOCA) of Both Knee Joints After Guillain-Barré Syndrome. *Cureus* 8, e480.
16. Genêt, F., Jourdan, C., Schnitzler, A., Lautridou, C., Guillemot, D., Judet, T., Poiraudeau, S., and Denormandie, P. (2011). Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PloS One* 6, e16632.
17. van Kampen, P.J., Martina, J.D., Vos, P.E., Hoedemaekers, C.W.E., and Hendricks, H.T. (2011). Potential risk factors for developing heterotopic ossification in patients with severe traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 26, 384–391.
18. Dejerine-Klumpke, A., and Ceillier, A. (1918). Paraostéarthropathies des paraplégiques par lésion médullaire. *Etude clinique et radiologique.*, 497–535.
19. Brady, R.D., Shultz, S.R., McDonald, S.J., and O'Brien, T.J. (2018). Neurological heterotopic ossification: Current understanding and future directions. *Bone* 109, 35–42.
20. Flin, C., Curalucci, H., Duvocelle, A., and Viton, J.M. (2002). [Heterotopic ossification and brain injury]. *Ann. Readaptation Med. Phys. Rev. Sci. Soc. Francaise Reeducation Fonct. Readaptation Med. Phys.* 45, 517–520.
21. Hendricks, H.T., Geurts, A.C.H., van Ginneken, B.C., Heeren, A.J., and Vos, P.E. (2007). Brain injury severity and autonomic dysregulation accurately predict heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *Clin. Rehabil.* 21, 545–553.
22. Garland, D.E., Hanscom, D.A., Keenan, M.A., Smith, C., and Moore, T. (1985). Resection of heterotopic ossification in the adult with head trauma. *J. Bone Joint Surg. Am.* 67, 1261–1269.
23. Citak, M., Suero, E.M., Backhaus, M., Aach, M., Godry, H., Meindl, R., and Schildhauer, T.A. (2012). Risk factors for heterotopic ossification in patients with spinal cord injury: a case-control study of 264 patients. *Spine* 37, 1953–1957.
24. Thefenne, L., de Brier, G., Leclerc, T., Jourdan, C., Nicolas, C., Truffaut, S., Lapeyre, E., and Genet, F. (2017). Two new risk factors for heterotopic ossification development after severe burns. *PloS One* 12, e0182303.
25. Genêt, F., Minoee, K., Jourdan, C., Ruet, A., Denormandie, P., and Schnitzler, A. (2015). Troublesome heterotopic ossification and stroke: Features and risk factors. A case control study. *Brain Inj.* 29, 866–871.
26. Goodman, T.A., Merkel, P.A., Perlmutter, G., Doyle, M.K., Krane, S.M., and Polisson, R.P. (1997). Heterotopic ossification in the setting of neuromuscular blockade. *Arthritis Rheum.* 40,

1619–1627.

27. Huang, H., Cheng, W.-X., Hu, Y.-P., Chen, J.-H., Zheng, Z.-T., and Zhang, P. (2018). Relationship between heterotopic ossification and traumatic brain injury: Why severe traumatic brain injury increases the risk of heterotopic ossification. *J. Orthop. Transl.* 12, 16–25.
28. Genêt, F., Kulina, I., Vaquette, C., Torossian, F., Millard, S., Pettit, A.R., Sims, N.A., Anginot, A., Guerton, B., Winkler, I.G., Barbier, V., Lataillade, J.-J., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., Hutmacher, D.W., and Levesque, J.-P. (2015). Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle. *J. Pathol.* 236, 229–240.
29. Torossian, F., Guerton, B., Anginot, A., Alexander, K.A., Desterke, C., Soave, S., Tseng, H.-W., Arouche, N., Boutin, L., Kulina, I., Salga, M., Jose, B., Pettit, A.R., Clay, D., Rochet, N., Vlachos, E., Genet, G., Debaud, C., Denormandie, P., Genet, F., Sims, N.A., Banzet, S., Levesque, J.-P., Lataillade, J.-J., and Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2017). Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI Insight* 2.
30. Bramlett, H.M., and Dietrich, W.D. (2015). Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes. *J. Neurotrauma* 32, 1834–1848.
31. Breslow, N. (1982). Design and analysis of case-control studies. *Annu. Rev. Public Health* 3, 29–54.
32. Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., Brunkhorst, F.M., Rea, T.D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J.M., Shankar-Hari, M., Singer, M., Deutschman, C.S., Escobar, G.J., and Angus, D.C. (2016). Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 762.
33. Shankar-Hari, M., Phillips, G.S., Levy, M.L., Seymour, C.W., Liu, V.X., Deutschman, C.S., Angus, D.C., Rubenfeld, G.D., Singer, M., and for the Sepsis Definitions Task Force. (2016). Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 775.
34. Baker, S.P., O'Neill, B., Haddon, W., and Long, W.B. (1974). The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J. Trauma* 14, 187–196.
35. Vincent, J.-L., Sakr, Y., Sprung, C.L., Ranieri, V.M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J.-R., Payen, D., and Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. (2006). Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* 34, 344–353.
36. Lu, J., Goh, S.J., Tng, P.Y.L., Deng, Y.Y., Ling, E.-A., and Moochhala, S. (2009). Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 3795–3813.

37. Sakellariou, V.I., Grigoriou, E., Mavrogenis, A.F., Soucacos, P.N., and Papagelopoulos, P.J. (2012). Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 12, 230–240.
38. Scott, B.N.V., Roberts, D.J., Robertson, H.L., Kramer, A.H., Laupland, K.B., Ousman, S.S., Kubes, P., and Zygun, D.A. (2013). Incidence, prevalence, and occurrence rate of infection among adults hospitalized after traumatic brain injury: study protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 2, 68.
39. Rello, J., Ausina, V., Ricart, M., Puzo, C., Net, A., and Prats, G. (1992). Nosocomial pneumonia in critically ill comatose patients: need for a differential therapeutic approach. *Eur. Respir. J.* 5, 1249–1253.
40. Adly, A., Youssef, T.A., El-Begermy, M.M., and Younis, H.M. (2018). Timing of tracheostomy in patients with prolonged endotracheal intubation: a systematic review. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 275, 679–690.
41. Simonsen, L.L., Sonne-Holm, S., Krasheninnikoff, M., and Engberg, A.W. (2007). Symptomatic heterotopic ossification after very severe traumatic brain injury in 114 patients: incidence and risk factors. *Injury* 38, 1146–1150.
42. Garland, D.E. (1988). Clinical observations on fractures and heterotopic ossification in the spinal cord and traumatic brain injured populations. *Clin. Orthop.* , 86–101.
43. Gaddam, S.S.K., Buell, T., and Robertson, C.S. (2015). Systemic manifestations of traumatic brain injury. *Handb. Clin. Neurol.* 127, 205–218.
44. Ritzel, R.M., Doran, S.J., Barrett, J.P., Henry, R.J., Ma, E.L., Faden, A.I., and Loane, D.J. (2018). Chronic Alterations in Systemic Immune Function after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 35, 1419–1436.
45. Vermeij, J.-D., Aslami, H., Fluiter, K., Roelofs, J.J., van den Bergh, W.M., Juffermans, N.P., Schultz, M.J., Van der Sluijs, K., van de Beek, D., and van Westerloo, D.J. (2013). Traumatic brain injury in rats induces lung injury and systemic immune suppression. *J. Neurotrauma* 30, 2073–2079.
46. Moiyadi, A.V., Devi, B.I., and Nair, K.P.S. (2007). Urinary disturbances following traumatic brain injury: clinical and urodynamic evaluation. *NeuroRehabilitation* 22, 93–98.
47. Piek, J., Chesnut, R.M., Marshall, L.F., van Berkum-Clark, M., Klauber, M.R., Blunt, B.A., Eisenberg, H.M., Jane, J.A., Marmarou, A., and Foulkes, M.A. (1992). Extracranial complications of severe head injury. *J. Neurosurg.* 77, 901–907.
48. Dizdar, D., Tiftik, T., Kara, M., Tunç, H., Ersöz, M., and Akkuş, S. (2013). Risk factors for developing heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *Brain Inj.* 27, 807–811.

49. Iwashyna, T.J., Ely, E.W., Smith, D.M., and Langa, K.M. (2010). Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 304, 1787–1794.
50. Ackman, J.B., and Rosenthal, D.I. (1995). Generalized periarticular myositis ossificans as a complication of pharmacologically induced paralysis. *Skeletal Radiol.* 24, 395–397.
51. Zynnurodlu, M., Kaymak Karatap, G., and Sepycy, V. (2008). Heterotopic ossification due to neuromuscular blocking agent in adult respiratory distress syndrome. A case report. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 44, 81–85.
52. Bourenne, J., Hraiech, S., Roch, A., Gannier, M., Papazian, L., and Forel, J.-M. (2017). Sedation and neuromuscular blocking agents in acute respiratory distress syndrome. *Ann. Transl. Med.* 5, 291.

CHAPITRE 4 : Etude de l'efficacité sur la douleur d'un traitement par infiltration de corticoïdes au site de développement des POAN chez l'Homme

L'inflammation paraît être très présente tout au long du développement des POAN, même à la phase chronique. Comme pour certaines pathologies articulaires (arthrose), les POAN peuvent provoquer des douleurs inflammatoires, musculaires ou mixtes. Le développement des POAN, nous l'avons vu, peut être source de douleurs inflammatoires. Une fois constituées, les POAN peuvent présenter une zone de conflit entre deux surfaces osseuses ou bien frotter contre des structures ligamentaires source de douleurs mécaniques voire de douleurs inflammatoires lorsque les traumatismes sont répétitifs.

Comme évoqué dans les chapitres précédents, la chirurgie reste aujourd'hui l'unique traitement curatif permettant de traiter les POAN symptomatiques. Cependant, l'exérèse chirurgicale, même partielle, de POAN n'est pas dénuée de risque chez les patients présentant de lourdes séquelles neurologiques parfois associées à des comorbidités. En l'absence de complications induites par le développement de POAN, une prise en charge moins invasive est privilégiée en première intention. C'est par exemple le cas des POAN douloureuses. Cependant, le traitement des douleurs induites par la présence de POAN n'est pas toujours facile à manipuler chez des patients après atteinte du SNC. Les effets indésirables induits par les antalgiques oraux tels que les AINS, le néfopam et les opioïdes peuvent être source de constipation, rétention urinaire, confusion, abaissement du seuil épileptogène, saignements et retard de consolidation osseuse. C'est pourquoi dans l'étude présentée ici, nous avons imaginé qu'une injection de dérivé cortisoné directement au contact de la POA permettrait de réduire les douleurs induites par la présence de POAN. Dix-sept patients présentant des douleurs spontanées induites par des POAN ont ainsi reçu une infiltration de dérivé cortisoné sous contrôle radiologique. Un mois plus tard, 80% des patients présentait un soulagement de la douleur provoquée par la présence d'une POAN. Dans le cas de la hanche, le succès était plus important lorsque l'infiltration était réalisée dans une zone de conflit osseux provoqué par l'entrechoquement de deux pièces osseuses. Pour les douleurs induites par des POAN au coude et au genou, les infiltrations au contact de la POAN étaient plus efficaces. Les infiltrations de dérivés cortisonés au site de développement des POAN paraît donc être une alternative intéressante et peu invasive dans la prise en charge antalgique des POAN douloureux.

L'article suivant est en cours de révision dans la revue Disability and Rehabilitation.

Corticosteroid injection is an alternative therapeutic strategy to treat pain in Neurogenic Heterotopic Ossification: a Case Series.

Marjorie Salga^{1,2}, Laure Gatin³, Tristan Thiry⁴, Fanantenana Hanitrinony Raoninah^{6,7}, Philippe Denormandie³, Charlotte Debaud¹, Robert Carlier^{1,4,5}, François Genêt^{1,2,5}.

¹ University of Versailles Saint Quentin en Yvelines-Paris-Saclay, END:ICAP U1179 INSERM, UFR des Sciences de la Santé–Simone Veil, Montigny le Bretonneux, France

² Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Raymond Poincaré Hospital, APHP, Garches, France

³ Department of Neuro-orthopedic surgery, DMU orthopedic surgery, GH APHP Paris-Saclay University, Raymond Poincaré Hospital, Garches, France

⁴ Department of Radiology, DMU Imaging, GH APHP Paris-Saclay University, Raymond Poincaré Hospital, Garches, France

⁵ Clinical and technological investigation center CIC-IT 1429, GH APHP Paris-Saclay University, Garches, France

⁶ University of Antananarivo, Antananarivo, Madagascar

⁷ Department of Motor Rehabilitation Center of Madagascar, Antsirabe, Madagascar

Corresponding Author:

Dr Marjorie Salga

Service de Médecine Physique et de Réadaptation

CHU R. Poincaré

104 Bd R. Poincaré

92380 Garches, France

Tel : +33 1.47.10.70.82

Fax +33 1.47.10.70.73

Mail : marjorie.salga@aphp.fr

Abstract

Treatment for pain related to neurogenic heterotopic ossifications (NHO) is particularly hard to manage for physicians. Systemic side effects caused by painkillers, and surgical resection are physically challenging for patients who have suffered neurologic injuries. We describe corticosteroid injections at the site of NHO as an alternative treatment for pain. Seventeen patients were treated for spontaneous pain associated with NHO by infiltration with corticosteroids. One month later, pain relief was noted in the vast majority of patients. Successful relief was more likely when infiltrations occurred at the conflict zone for hip-associated NHO, while on-contact infiltrations were more effective for NHO-involved knee and elbow pain.

Keywords: Neurogenic heterotopic ossification, Pain, Corticosteroid injection, Spinal cord injury, Traumatic brain injury, Osteogenesis

Abbreviations: CNS: central nervous system; GAS: goal attainment scale; NHO: neurogenic heterotopic ossifications; NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drugs; TBI: traumatic brain injury; SCI: spinal cord injury

Introduction

Heterotopic ossifications (HO) are benign ectopic lamellar bones that develop within the soft tissue surrounding extracapsular joints [303]. HO associated with various disorders of the central nervous system (CNS) are referred to as neurogenic heterotopic ossifications (NHO). NHO are detected in 5-20% of traumatic brain injury (TBI), and 20-29% of spinal cord injury (SCI) patients [140]. Most commonly, NHO develops in paralyzed or sub-lesional areas [304,305]. At an early stage of development, NHO causes inflammatory symptoms such as pain, redness, tumefaction and swelling. As ossifications increase in size, gradual reduction of range of motion often progresses into joint ankyloses, and complications occur like nerve and blood vessel compression [306] or skin bedsores [307]. These symptoms can lead to reduced capacity for movement affecting positioning of patients in bed, wheel chairs and walking soon after the initial trauma [308]; further exacerbating patient morbidity. Occurrence of NHO delays patients recovery from injury, interrupts rehabilitation programs and lengthens hospital stays [309].

Pain related to NHO development can have three different presentations: i) inflammatory at an early stage of NHO development, ii) mechanic resulting from the mobilization of the joint surrounded by NHO that can induce frictions with musculoskeletal structures nearby or a contact between bones creating a conflict zone, and iii) neuropathic when NHO is crushing a nerve. Some patients can present a combination of different types of pain called mixed pain. Details and intensity of pain can be hard to determine in patients with neurological sequela. After CNS damage, patients can present partial sensory loss, cognitive and communication impairment that complicate the evaluation of pain. Therefore, Kiresuk and Sherman [310] specifically developed for patients with mental health issues, the Goal Attainment Scale (GAS) to assess the efficiency of a therapy on outcomes based on specific goals that are important for patients and/or caregivers. It was then adapted to the rehabilitation field [311].

Since the first description of NHO during World War I [11], surgical resection of troublesome NHO remains the best treatment and provides some benefit for morbidity [108,312]. However this procedure is physically challenging for fragile SCI and TBI patients; complications of relapse and infection at the site of surgery are commonplace [112,309,313]. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and radiotherapy have been described to prevent NHO development [92,305]. These treatments can also reduce the pain induced by NHO growth [68,92]. However, NSAID and radiotherapy also have adverse events that could aggravate patient's morbidity [68]. NSAID increases the risk of gastric ulcers, bleeding and systemic infections [68]. For these patients who are often very young, radiotherapy may be responsible for delayed wound and bone healing, osteonecrosis, developing radiation-induced sarcoma as well as infertility due to genital organs irradiation when NHO is located around the hip [68]. Therefore, NSAID and radiotherapy are cautiously used to prevent NHO occurrence in patients after CNS damage. Other painkillers are usually prescribed; the class and the dose depend on the intensity of pain. Sometimes, high dose of painkillers class 2 or 3 from



World Health Organization classification, are needed to treat intense pain provoked by NHO. They can also induce side effects like constipation, urinary retention, confusion, cognitive impairment which increase patients discomfort and morbidity [314].

Local injection of corticosteroids is currently performed in musculoskeletal diseases that provoke pain [315]. Intra-articular corticosteroid injections are the most clinically used anti-pain injection to treat inflammatory or mixed (inflammatory and mechanical) pain, and has been widely studied in both general and athlete populations [315,316]. Local administration of corticosteroid prolongs concentration at the site of the injection for a maximal local anti-inflammatory effect, while minimizing harmful corticosteroids systemic effects [317]. Thus, this technic appears to be a promising alternative to oral painkillers, radiotherapy and surgery in disabled patients susceptible to treatments' complications, to manage pain induced by NHO.

To our knowledge, corticosteroid injection at the site of NHO development, to treat pain, has not been described previously. Our present study assesses the efficacy of a single corticosteroid injection at the contact of the NHO to elicit pain relief in patients presenting neurologic sequelae after CNS injury.

Materials and methods

Participants:

The patient cohort was derived from the neurorehabilitation department of a tertiary care Hospital. Patients presenting painful NHO around either hip, knee, elbow or shoulder, were recruited to this study. Imaging (X-ray or CT-scan) exams were performed to confirm the diagnosis of NHO and define it. Three-dimensional reconstructions were carried out to precise NHO settings (location, size, ankyloses, polarity (uni/bipolar), presence of a conflict zone), the relation between NHO and other structures (nerves, vessels) and impact of NHO development on joint (mineral density, arthritis) as described by Carlier *et al* [79]. Medical history and routine clinical exam were realized including mobilization of the joint surrounded by NHO, in all range of motion. If the joint mobilization was limited by pain, it was notified by the physician on the medical report.

Outcome measures:

GAS was used to assess the efficiency of corticosteroid injection on pain caused by NHO. The goal of the treatment was to release pain and GAS was scored on 5-point scale (-2, Increase of the pain perception; -1 spontaneously painful; 0, no pain spontaneously but pain during joint mobilization with limitation of the range of motion; +1, no pain spontaneously but pain during joint mobilization without limitation of the range of motion; and +2, no pain during the mobilization in all the range of motion). The GAS was scored before the corticosteroid infiltration and 4 weeks after, by patients and caregivers after characterizing the pain and a clinical exam.

Intervention:

Indication for corticosteroid infiltration was a spontaneous pain (inflammatory or mechanical or both) induced by NHO development whatever NHO location, size and painkillers given. Infiltration of

corticosteroids at the site of NHO development was carried out by a musculoskeletal radiologist confident with disabled patients care, under radiological guidance (CT-scan, ultrasonography or radioscopy). Contrast agent (non-ionic iodinated contrast media) was injected before corticosteroid to target precisely the zone to inject. Sites for injections were either a conflict zone corresponding to the space between two parts of the NHO or bone and NHO, on-contact with NHO or intra-articular in the joint surrounded by NHO. Corticosteroid drugs injected were betamethasone 2 mg/ml, hydrocortisone 5.5 mg/ml or cortivazol 3.75 mg/1.5 mL. Pain medication was not modified during the month following corticosteroid injection.

Data collection was carried out retrospectively from patients' file and included age at the time of the accident, gender, etiology of the CNS damage, time from onset of CNS to NHO diagnosis and corticosteroid infiltration, NSAID administration before infiltration, NHO radiological settings (location, size, ankyloses, polarity, presence of a conflict zone), corticosteroid drugs injected and imaging used for radiological guidance. Complications after injections (hematoma, infections) were also reported.

Ethical considerations

This retrospective study was non-interventional with usual procedures and without additional interventions; therefore, patient's consent was not needed. The authors confirm that the named institutional review board specifically waived the need for consent for this study. According to the law from the 6th of January 1978 modified in 2004, the present work has been declared to the National Agency regulating Data Protection, CNIL under the number 2212374 v 0.

Data analysis:

Data were reported as mean \pm standard deviation (SD), numbers and percentages. A Chi-square test was used to examine changes in GAS assessing pain one month after corticosteroid injection between: i) the group treated with NSAID and the group that did not receive NSAID, ii) the different corticosteroid drugs injected, and iii) the different imaging used for radiological guidance (GraphPad Prism 5 software (GraphPad Softwares, La Jolla, CA), $p < 0.05$).

Results

To study the role of corticosteroid injection on pain induced by NHO, we compared GAS assessing pain before and one month after NHO infiltration with corticosteroid for the same patient.

Between May 2012 and June 2018, a total of 17 infiltrations of corticosteroid involving 17 patients were carried out for painful NHO (Table 1). Men were more concerned than women by a 12:5 ratios and the average age at the day of accident was 40 \pm 18 years (from 18 to 73 years). The etiologies of CNS lesions are reported in Table 1. The most common NHO locations which received corticosteroid injection for pain were the hip (70.0%) and the knee (18.0%). The delay between CNS damage and diagnosis of NHO was 20.8 \pm 44.2 months. Corticosteroid infiltrations were carried out 22.7 \pm 43.6 months after CNS lesion.

Before corticosteroid infiltration, all patients presented spontaneous pain at the joint surrounded by NHO (GAS -1). One month after corticosteroid infiltration, GAS increased for 14 patients (82%): 7 with GAS 0 and 7 with GAS +1 (Figure 1A). Pain-causing NHO were present at variable anatomical sites in different patients, and all were treated with corticosteroid infiltration. Among the 12 NHO infiltrated at the hip, 9 (75%) patients declared pain relief (GAS \geq 0) one month after corticosteroid injection (Figure 1B). While pain-causing NHO at other anatomical sites concerned few cases (knee n = 3 and elbow n=2). The same trend of eliminating pain was seen with the knee and elbow involving NHO where 100% yielded pain relief (Figure 1B).

We study whether location of NHO around the hip is an important variable to predict the efficiency of corticosteroid infiltration on pain. NHO of the hip were either anterior (n=8), posterior (n=3) or superior (n=1) to the hip (Figure 2A). GAS improved to \geq 0, one month after corticosteroid injection for all anterior NHO of the hip. While the sample size was extremely low, posterior and superior NHO infiltration was less effective, as one (33%) and no (0%) patients reported pain relief (Figure 2A).

A key morphological variable in NHO development around joints is the formation of conflict zones, where movement results in NHO-to-bone contact. This process causes pain and inflammation, thus we determined if infiltrate of these NHO at the conflict zone would provide a benefit in the form of pain relief. At the hip, NHO forming a conflict zone were exclusively injected in this area (n=8) while NHO without conflict zone were injected on-contact with NHO (n=4). Seven patients declared a GAS \geq 0 one month after corticosteroid injection in a conflict zone (88%), versus 2 patients injected on-contact with NHO (50%) (Figure 2B). Efficacy of corticosteroid infiltration on pain at the hip (GAS \geq 0) was higher in NHO injected in a conflict zone, than injection on-contact with NHO when no conflict was present. For other NHO locations (knee and elbow), when no conflict zone was present we speculated that pain was resulting from repetitive frictions between musculoskeletal tissues and NHO. Therefore, corticosteroid was injected on-contact with NHO in order to decrease inflammation due to repetitive tissues frictions. NHO inducing pain at the knee (n=3) and elbow (n=2) were exclusively infiltrated on-contact with NHO, however one NHO located around the elbow presented a conflict zone. All patients reported pain relief after on-contact infiltration (GAS \geq 0) (Figure 1B).

NSAID administration, different corticosteroid drugs injected and imaging used for radiological guidance were similar patients with GAS -1 and GAS \geq 0 one month after corticosteroid infiltrations (Table 2). No side effects (hematoma or infection) were reported after corticosteroid infiltration.

Discussion

This study describes the use of local corticosteroid injection as a novel technique to treat pain induced by the development of NHO around joints.

NHO is a neuro-orthopedic complication that has been described to aggravate cognitive and behavior functions after severe TBI [318]. Treating pain related to NHO appears challenging in fragile patient suffering from multiple comorbidities after CNS damage. Indeed, painkiller drugs and surgery for NHO

removal are the mainstay for treating pain in this population, yet they increase patient morbidity and mortality risk [240,319]. For this reason, we used local injection of corticosteroids, an ancestral anti-inflammatory treatment reducing pain in musculoskeletal and osteoarthritis pathologies [315], in order to treat pain induced by NHO. Using this course of treatment, 82% of patients declared that pain decreased after corticosteroid infiltration at the site of NHO development. While the infiltration of corticosteroid was effective at eliminating pain caused by NHO, location for the infiltration seems to be important and dependent on the mechanism that cause pain.

When confronted with joint pain, identifying the type (inflammatory, mechanic, neuropathic) is essential to define a course of treatment for the patient [314]. Inflammatory peri-articular pain, associated with swelling and general inflammation, is a common symptom during the early development of NHO [20], while nerve compression induced by NHO can be responsible for neuropathic pain [306]. The most frequent nerve entrapment caused by NHO involves the ulnar nerve at the elbow [320] and the sciatic nerve at the hip [306]. NHO can also be responsible in mechanic peri-articular pain. The friction between NHO and adjacent musculoskeletal structures during mobilization of the joint surrounded by NHO can be responsible for causing pain; so too is the brutal contact between bone and NHO, or between pieces of NHO during joint motion (Figure 3). Similarly to musculoskeletal pathologies, repetitive contacts between joints surface or friction with musculoskeletal tissues can be responsible for mechanical and/or inflammatory pain [321]. In this situation, corticosteroid injections have been described as an efficient local treatment [315,317]. Therefore, we applied this technic to NHO spontaneously inducing mechanic and/or inflammatory pain.

Accuracy of local corticosteroid deposition has been described as an essential condition on efficiency and reducing pain [322]. NHO infiltration technic remains particularly difficult, because of proximity to adjacent structures such as blood vessels, nerves. The complex morphology of NHO structure makes access to the site of injection challenging [79]. Furthermore, corticosteroids infiltrates are of a liquid consistency that spreads along anatomical structures, diluting its local uptake. Therefore, radiological guidance is inevitable for NHO corticosteroid injection and help to precisely target the zone responsible for pain. We identified two target sites, depending on NHO morphology and the origin of the pain. The first, a conflict zone where NHO was colliding with bone or with another piece of NHO, was targeted for delivery to treat pain caused by the repetitive contacts. Infiltrations performed in a conflict zone were successful to eliminate pain for 88% patients, with the majority located anterior around the hip. The second site, a zone of frictions between NHO and adjacent musculoskeletal structures during joint mobilization, was injected to decrease pain. Typically, NHO developing at the inner part of the knee grows with a close contact with the medial collateral ligament, responsible in pain during flexion-extension movements. On-contact infiltrations decreased pain for all the patients with NHO located around the knee and elbow. Thus, to decrease pain provoked by NHO, corticosteroid infiltrations are more efficient when carried out in a conflict zone, specifically for anterior NHO at the

hip. In the absence of conflict zone, corticosteroid should be realized on-contact with NHO with better results on pain for NHO located at the knee and elbow compared to NHO at the hip.

A surgical endpoint is unavoidable if pain caused by NHO is too severe [108]. However, disabled patients can be too fragile to handle surgery due to comorbidities [240], therefore corticosteroid infiltration provides an alternative which overcomes the need for invasive surgery. Results from our study showed that when the infiltration was effective (82%), patients reported no spontaneous pain (GAS 0) or no spontaneous pain and improved joint mobilization (GAS +1). Thus, corticosteroid infiltration presents as an effective treatment for reducing pain in NHO patients. The level of pain reduction achieved may be sufficient to differ the need for invasive surgery.

Opioids and NSAIDs are routinely prescribed to treat pain but their pharmacological properties can further exacerbate medical complications, common to patients who have endured CNS damage and are burdened with organ dysfunction [314]. Opioid effects enhance cognitive impairment, drowsiness, and dizziness, increasing the risk of further injury caused by falling and accidental self-harm [314]. NSAIDs delay bone fracture healing, aggravate on-going infections and increase the risk of gastro-intestinal and intra-cranial bleeding [90]. Patients in this study were receiving opioid treatment from the onset. Meanwhile, it was known for almost half (47%) of our patient cohort had received NSAIDs before corticosteroid infiltration, 87.5% of which reported a positive outcome. Therefore, it remains unknown whether the effects elicited by the infiltration was a consequence of a combinatorial effect. Further studies should be pursued to address this point, as the elimination of opioid use in this patient population may be beneficial.

Local infiltration with corticosteroid to treat pain and regain function caused by musculoskeletal diseases is effective as a short term treatment [323]. However, there is minimal or no improvement on long-term outcomes. It is likely that this same treatment for NHO-associated pain would also be transitional. To produce a long term effect, local corticosteroid injections may require repeated administrations which has its own risks. A rare complication associated with corticosteroid injections is the development of local infections due to immunosuppression [317]. Patients with permanent CNS damage, such as NHO patients, are particularly susceptible to infections [324]. In light of this associated risk, local corticosteroid infiltrations performed in our study did not result in any complications. Future studies should be performed to determine the effect of repeat injections on long term pain management and the associated risks. Local administration of corticosteroid in NHO patients was safe, and may replace or potentiate painkiller usage.

The present study presented few limitations. Indeed, the cohort was small and data had been collected retrospectively. The study was conducted in the same Hospital and injections were performed by the same radiology department with standardized procedures. Therefore, patients' characteristics and injections' features had been collected in a precise manner. The aim of the corticosteroid injection in this study was to provide pain release. Thus, we chose to assess pain with GAS that we believe more appropriate for patients with neurological deficiencies. However, the benefit of the treatment was not

based on functional improvement such as ability to walk and seat properly in a wheel chair or enhancement of cognitive and behavior capacities. Future direction will be conducted to study the effect of corticosteroid infiltration in painful NHO on functional activities.

Conclusion:

This study is the first describing corticosteroid infiltration as an alternative treatment to reduce mechanical and/or inflammatory pain induced by NHO. Joints motion can provoke pain because of frictions between surrounding NHO and musculoskeletal structures (knee and elbow) or repetitive contacts between a bone and NHO or two pieces of NHO, creating a conflict zone (hip). Corticosteroid infiltration was carried out in a conflict zone, if present; otherwise, the injection was performed on-contact with NHO. At the hip, success of corticosteroid infiltration was more important for NHO injected in a conflict zone than injection on-contact. For NHO located around knee and elbow, only corticosteroid injected on-contact with NHO were efficient on pain. Within the limitations of this retrospective design, our findings question the place of local corticosteroid to treat pain provoked by NHO after CNS damage in patients.

Word count: 3149

Acknowledgments

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

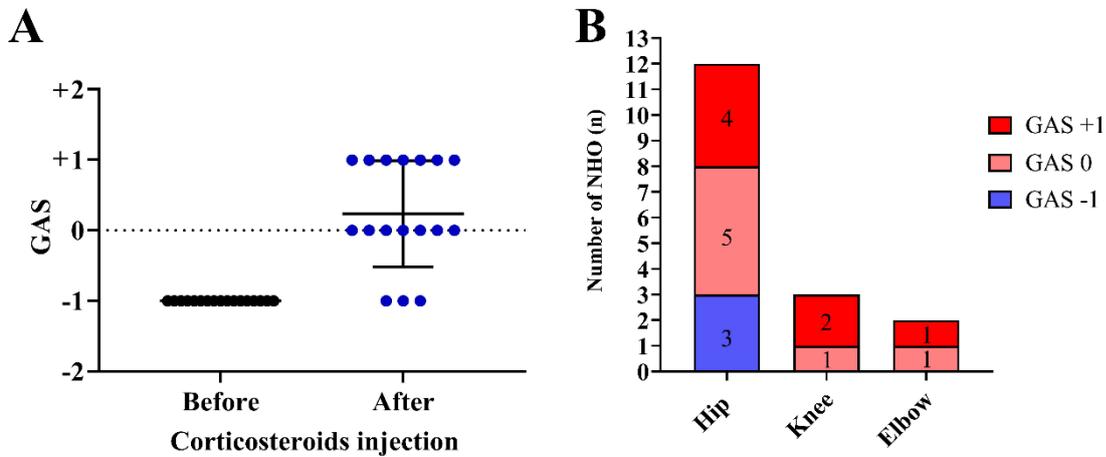


Figure 1. Pain assessed with GAS for painful NHO located around hip, knee or elbow and treated with corticoid injection; A. GAS before and one month after corticosteroid injection for painful NHO. B. GAS one month after corticosteroid injection depending on joint affected by NHO development (n=17).

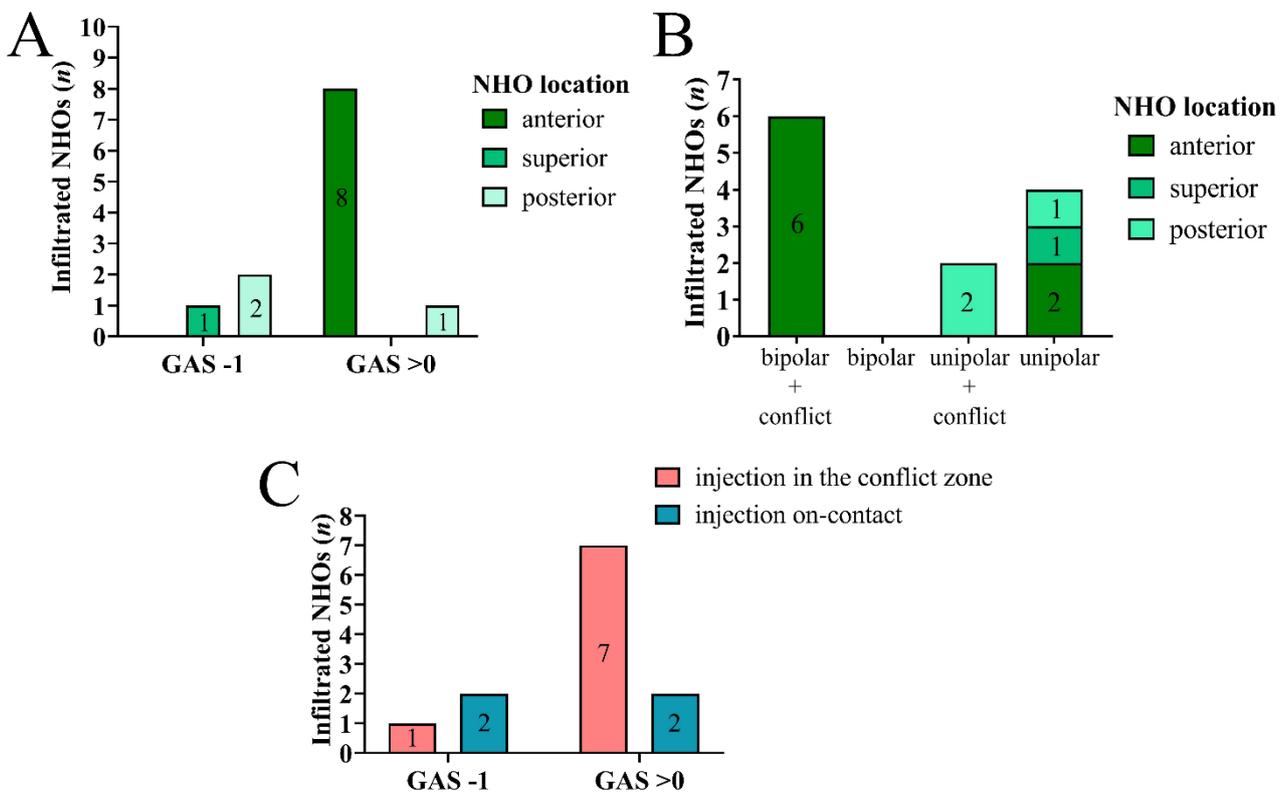


Figure 2. Pain assessed with GAS one month after corticosteroid injections for painful NHO surrounding the hip. A. depending on NHO location around the hip, B. depending on NHO

morphology and the presence of a conflict zone.



Figure 3. Radiological imaging of NHO and corticoid injections under radiological guidance; A. CT-scan with 3 dimensional reconstruction showing an anterior NHO of the left hip with a large conflict zone (arrow) between 2 pieces of NHO, one attached to the ilio-pubic rami and the second one, implanted on the lesser trochanter; B. Corresponding pelvic X-Ray; C. Corticosteroid injection under CT-scan guidance with needle located into the conflict zone; D. Axial section of CT-scan showing a metaphyso-epiphyseal NHO of the left knee; E. Coronal section of the same CT-scan showing the NHO located anteriorly to the medial collateral ligament; F. Corticosteroid injection on-contact with the distal extremity of the NHO.

Variables		
Age, years, mean \pm 95%CI (minimum; maximum)		40 \pm 8 (18; 73)
Gender, n, (%)	Female	5 (29%)
	Male	12 (71%)
Etiology of CNS damage, n, (%)	TBI	6 (35%)
	Stroke	3 (19%)
	Cerebral anoxia	1 (7%)
	Encephalitis	1 (7%)
	SCI	4 (25%)
	Other	1 (7%)
NHO location, n, (%)	Hip	12 (70%)
	Knee	3 (18%)
	Elbow	2 (12%)
Delay between CNS damage and NHO diagnosis (CT-scan or x-ray), months mean \pm 95%CI (minimum; maximum)		20.8 \pm 22 (1; 183)
Delay between CNS damage and corticosteroids infiltration, months mean \pm 95%CI (minimum; maximum)		22.7 \pm 21 (1; 187)

Table 1. Demographic data and NHO features.

		Total (<i>n</i> =17)	GAS -1	GAS \geq 0	<i>p</i> -value (Chi-square test)
NSAID administration before corticosteroids infiltrations, n, (%)	Yes	8 (47%)	1	7	0.4
	No	6 (35%)	2	4	
	Missing data	3 (18%)	0	3	
Corticosteroids drugs injected, n, (%)	Cortivazol	8 (47%)	1	7	0.7
	Betamethasone	6 (35%)	1	5	
	Hydrocortancyl	2 (12%)	0	2	
	Missing data	1 (6%)	1	0	
Radiological guidance, n, (%)	CT-scan	12 (70.5%)	3	9	0.8
	Radioscopy	4 (23.5%)	0	4	
	Ultrasonography	1 (6%)	0	1	

Table 2. Impact of NSAIDs administration, corticosteroids drugs injected and imaging used for radiological guidance on GAS assessment one month after corticosteroids infiltration.

References

Cf references of the PhD manuscript.

CHAPITRE 5 : Création d'une banque de données clinico-biologiques chez des patients hospitalisés en services de soins aigües pour la recherche de marqueurs spécifiques prédictifs, notamment inflammatoires, du développement précoce de POAN chez l'Homme « BENTHOS ».

Comme évoqué dans ce manuscrit de thèse, les études rétrospectives comportent des limites. Les variations de méthodologies, le faible nombre de patients et la présence de facteurs confondants ne permettent pas toujours d'identifier avec certitude les facteurs de risque impliqués dans la formation de POAN. C'est suite à cette constatation qu'a été créé le modèle murin développant des OH, le plus fidèlement à la pathologie humaine, avec un objectif double. Le premier était d'étudier plus précisément et de façon indépendante certains des facteurs de risque clinique, le second était de préciser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation d'OH. Ce modèle comporte également des limites telles que le problème de la transposition des résultats à l'homme, la taille réduite de l'animal qui ne permet pas d'effectuer certains gestes chirurgicaux et enfin, la localisation des OH qui n'est pas peri-articulaire, contrairement à l'homme.

Cependant, les études cliniques réalisées par notre équipe à partir de la base de données BANKHO qui recense l'ensemble des caractéristiques des patients et des POAN opérées sur l'hôpital Raymond Poincaré, tout comme les données de la littérature et les résultats de l'étude présentés dans le Chapitre 3, nous permettent aujourd'hui d'avoir un profil plus précis des patients à risque de développer des POAN. De la même façon, les résultats obtenus par l'exploitation du modèle animal de Genêt et coll. couplés aux données de la recherche fondamentale sur le sujet des OHN, nous amène à une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la formation des OHN et par extension, des POAN.

A ce stade, il semble que la mise en place d'une étude prospective soit inévitable pour s'affranchir des biais liés aux études rétrospectives et faire le lien avec la recherche fondamentale.

En se basant sur les résultats des travaux collaboratifs et translationnels (homme-animal), nous allons donc démarrer en 2020, la toute première étude prospective sur les POAN sous le nom « BENTHOS » pour Biomarkers for Early développement of Heterotopic Ossification. Ce projet se déroulera en collaboration entre l'équipe du Pr Levesque, du Pr Banzet, et du Pr Genêt (investigateur principal), soit 2 équipes de recherche fondamentale et une équipe clinique.

Il s'agit d'une banque de données cliniques et biologiques qui à plusieurs objectifs. L'objectif principal est de préciser l'incidence sur une année de survenue de POAN dans les 9 mois suivant un traumatisme crânien et/ou une lésion médullaire. En effet, notre impression clinique est que l'incidence de POAN opérées diminue sans que cela n'ait été chiffré.

On compte 3 objectifs secondaires. 1/ la collection d'échantillons biologiques rendra possible le

dosage de molécules identifiées par la recherche fondamentale comme étant de potentiels biomarqueurs pouvant être corrélés à la survenue de POAN. 2/ Les paramètres cliniques seront recueillis de façon exhaustive et concerneront les données neurologiques, mécaniques, infectieuses et inflammatoires relatives à chaque patient sur une durée de 9 mois. 3/ A partir des données cliniques et biologiques, nous établirons un score de risque clinico-biologique de survenue de POAN, dans les 9 mois après le traumatisme, qui permettra de détecter précocement les patients à risque de développer des POAN. Un diagnostic précoce permettra un suivi rapproché des patients et d'adapter la prise en charge thérapeutique à l'évolution des POAN (administration d'AINS, infiltration de corticoïdes, chirurgie).

A terme, nous souhaiterions déterminer des molécules et/ou des paramètres cliniques, identifiés comme des éléments clés dans les mécanismes conduisant au développement de POAN, qui pourraient faire l'objet de cibles thérapeutiques.

L'étude BENTHOS concerne les patients, homme ou femme > 18 ans, ayant :

- Un traumatisme crânien avec score de Glasgow initial < 8,

Ou

- Un traumatisme crânien avec score de Glasgow initial entre 8 et 14 associé à un « Injury Severity Score » > 15 et une chirurgie dans les 24 heures suivant l'admission

Ou

- Une lésion médullaire traumatique complète (para/tétraplégie initiale)
- L'accident doit dater de moins de 48 heures
- Le consentement éclairé doit être signé par le patient ou un proche dans les 48 heures l'arrivée du patient en service de soins aigu.

L'étude sera proposée à tous les patients hospitalisés dans le service de réanimation ou de chirurgie orthopédique des Hôpitaux Beaujon et Georges Pompidou, répondant aux critères d'inclusion. Le consentement devra être signé par le patient ou sa personne de confiance s'il se trouve dans l'incapacité de consentir (voir consentement en annexe). La période d'inclusion sera d'une durée d'un an. Le suivi de chaque patient se fera sur 9 mois.

Sur le plan statistique, il a été estimé par Mme Jacota, statisticienne, que nous serions en mesure de recruter 118 patients pour cette étude au vue du nombre de patients traumatisés crâniens et blessés médullaires hospitalisés dans les services de réanimation et de chirurgie orthopédique des hôpitaux Beaujon et Georges Pompidou sur l'année 2018. Un effectif de 118 patients (dont 15% de perdus de vue) permettra d'estimer l'incidence de POAN attendue (environ 15% en se basant sur les données de la littérature) avec une précision de 7%, soit un IC 95% de 8-22 (alpha 5%).

Les dosages de liquides biologiques seront réalisés à J+2, J+8 et J+15 suivant l'arrivée des patients en service de soins aigus et concerneront le sang, les urines et le liquide céphalo-rachidien. Certains prélèvements correspondent à des examens de routines. D'autres seront stockés au centre de ressources biologiques de chaque hôpital avant d'être acheminés dans le laboratoire du Pr Banzet pour dosage de molécules spécifiques (détails en annexe). Ces molécules auront au préalable été identifiées par l'équipe du Pr Levesque comme intervenant dans le développement de OH dans le modèle murin.

Les paramètres cliniques seront recueillis tout au long de l'hospitalisation du patient en réanimation et/ou chirurgie orthopédique jusqu'à J+15 puis à 1, 2, 3, 6 et 9 mois de l'accident. Les informations recueillis à chaque visite sont détaillés dans le protocole en annexe.

Un examen d'imagerie sera réalisé en cas de suspicion clinique de POAN.

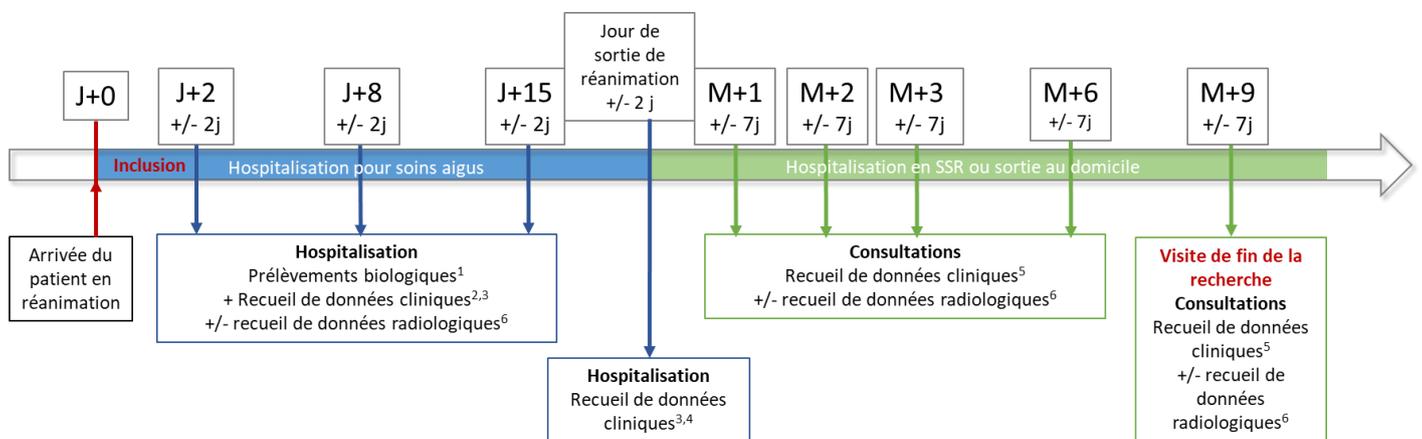


Figure 31. Schéma récapitulatif de la chronologie du projet « BENTHOS »

- ¹ Prélèvements biologiques
- ² Données cliniques à J+ 2 (+/- 2 jours)
- ³ Données cliniques à J+ 8, J+ 15 et le jour de sortie du service de réanimation (+/- 2 jours)
- ⁴ Données cliniques le jour de la sortie du service de réanimation (+/- 2 jours)
- ⁵ Données cliniques recueillis à M+1, M+2, M+3, M+6, M+9 (+/- 7 jours) de l'inclusion
- ⁶ Examens d'imagerie

L'étude BENTHOS s'inscrit dans les recherches interventionnelles à risques et contraintes minimales décrit par la loi Jardé. Les échantillons biologiques, même effectués pendant les examens de routine, sont prélevés en plus de la pratique clinique et sont donc considérés comme à l'origine d'un risque mineur pour le patient. L'étude BENTHOS sera mise en œuvre après avis favorable d'un Comité de Protection des Personnes (prévu pour 1^{er} trimestre 2020). L'autorisation de l'ANSM n'est pas requise.

Le document en annexe correspond au projet BENTHOS tel qu'il a été déposé à la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation et tel qu'il sera soumis au Comité de Protection des Personnes.

VI. Discussion, perspectives, conclusion

Cette thèse a cherché à préciser en partie, les mécanismes inflammatoires conduisant à la formation des POAN. Nous nous sommes basés sur la pathologie humaine et les études cliniques pour réaliser le premier travail de cette thèse. En effet, les études cliniques étant rétrospectives avec une méthodologie très hétérogène, il est difficile de faire précisément la différence entre facteurs inflammatoires impliqués dans la survenue de POAN et facteurs confondants, dépendant d'autres variables. Nous avons donc utilisé le modèle murin développant des OHN créé par Genêt et coll. afin d'étudier plus précisément l'effet de l'inflammation locale et systémique sur la survenue et le développement de OHN (Chapitre 1). Une première expérience a permis de montrer qu'une inflammation locale, induite par un composant de paroi d'*Escherichia Coli* ou de *Staphylococcus Aureus*, en plus de la cardiotoxine, augmente de façon significative le volume des OHN et cette augmentation se fait selon un effet-dose. Il semble donc que le niveau d'inflammation local influence de façon importante le volume des OHN. De plus, la provenance de ces agents de paroi bactérienne fait supposer que l'inflammation pourrait être spécifiquement induite par des pathogènes infectieux qui contribueraient ainsi au développement des OHN. De façon intéressante dans cette expérience, on pouvait également observer l'apparition de OH dans le groupe contrôle pour la section médullaire après injection de cardiotoxine et d'un agent de paroi bactérienne. Il semblerait donc qu'il existe un niveau inflammatoire seuil à partir duquel, la section médullaire n'est plus obligatoire pour la survenue de OH. C'est d'ailleurs ce que l'on observe dans les pathologies non neurologiques à haut niveau d'inflammation dans lesquelles se développent des POA (grands brûlés, amputés, polytraumatisés, long séjour en réanimation).

Dans une autre expérience sur le modèle murin développant des OHN, l'inoculation d'agent de paroi bactérienne se faisait par voie systémique et non pas en intramusculaire afin de se rapprocher des conditions rencontrées en pathologie humaine (Chapitre 1). On observait une augmentation du volume des OHN confirmant qu'une inflammation, même systémique, contribue à la croissance des OHN.

Toujours dans le même modèle murin, nous avons cherché à montrer l'effet du blocage de la jonction neuro-musculaire sur le volume des OHN (Chapitre 2). L'injection de toxine botulique, habituellement utilisé comme traitement de l'hyperactivité musculaire après lésion du SNC a montré une augmentation du volume des OHN. Nous sommes arrivés à la conclusion que la jonction neuro-musculaire semble réguler le développement des OHN dans un muscle pathologique chez la souris BM. Il est possible que cette régulation s'effectue via un mécanisme de neuro-inflammation locale. Cette hypothèse reste à démontrer.

Suite à ces découvertes en recherche fondamentale, nous sommes retournés au monde clinique pour rechercher des facteurs pourvoyeurs d'inflammation, notamment infectieux qui pourraient être présents à une phase très précoce suivant l'accident neurologique (Chapitre 3). Nous avons comparé

des patients TC avec POAN versus sans POAN, hospitalisés dans le même service de réanimation puis en rééducation neurologique. Cette étude a été la première à montrer que les patients avec POAN présentent de façon plus importante des infections à bacilles gram négatif et plus particulièrement à *Pseudomonas Aeruginosa*. Comme dans d'autres travaux, la présence d'un polytraumatisme associé et de chirurgies était corrélée à la survenue de POAN, tout comme une longue durée de la ventilation mécanique, de coma, du séjour en réanimation et la présence d'une trachéotomie. En revanche, aucun critère neurologique n'a été retrouvé comme augmentant le risque de POAN. A gravité neurologique égale, il semble donc que les patients développant des POAN soient plus fréquemment infectés avec des bacilles gram négatifs, dans un contexte de polytraumatisme, de chirurgies multiples et nécessitant des soins aigus prolongés, comparativement aux patients sans POAN.

L'inflammation paraît être très présente tout au long du développement des POAN, même à la phase chronique. C'est pourquoi, nous avons imaginé, comme pour certaines pathologies articulaires, injecter des dérivés cortisonés localement, dans le but de traiter les douleurs induites par certaines POAN (Chapitre 4). Dix-sept patients présentant des douleurs spontanées induites par des POAN ont ainsi reçu une infiltration de dérivé cortisoné sous contrôle radiologique. Un mois plus tard, 80% des patients présentait un soulagement des douleurs. Dans le cas de la hanche, le succès était plus important lorsque l'infiltration était réalisée dans une zone de conflit osseux provoqué par l'entrechoquement de deux pièces osseuses. Pour les douleurs induites par des POAN au coude et au genou, les infiltrations faites au contact de la POAN étaient plus efficaces. Les infiltrations de dérivés cortisonés au site de développement des POAN paraît donc être une alternative intéressante et peu invasive dans la prise en charge antalgique des POAN douloureux.

Les POAN posent toujours, à l'heure actuelle, le problème du diagnostic et de prise en charge trop tardive et trop invasive lors de l'apparition de complications. L'enjeu actuel est d'identifier les patients à risque de développer des POAN, le plus tôt possible après leur accident neurologique de façon à leur assurer un suivi et une prise en charge adaptée et précoce. En se basant sur les études cliniques et les données issues du modèle murin développant des POAN, nous allons relever des critères cliniques et biologiques reconnus comme étant corrélés à l'apparition de POAN dans une base de données clinico-biologique BENTHOS qui verra le jour courant 2020 (Chapitre 5). Ce tout premier travail prospectif sur les POAN permettra de repérer les patients à risque de développer des POAN et peut être à terme d'identifier des cibles thérapeutiques qui permettront de prévenir ou de guérir les POAN.

Ce travail de thèse comporte des limites comme nous l'avons détaillé dans chacun des articles. Les études précliniques ont parfois été réalisées sur un nombre inégal d'animaux (Chapitre 1). Ceci s'explique par la compilation des résultats provenant de deux études différentes, la première ayant généralement été répétée. Cependant, pour certains groupes, notamment les SHAM pour la BM, nous avons fait le choix de ne pas répéter l'expérience par soucis de réduction du nombre d'animaux

utilisés, dans les cas où les résultats étaient homogènes dans le groupe et permettaient de conclure à une différence.

Dans le travail sur le blocage de la jonction neuro-musculaire, nous n'avons pas directement montré que le signal inflammatoire était modulé par la toxine botulique (Chapitre 2). Une étude complémentaire pourrait consister à doser la substance P et certains cytokines inflammatoires (OSM, IL-1) localement après administration de toxine botulique. Il s'agirait également de déterminer si c'est le blocage de la jonction neuro-musculaire ou l'administration de toxine botulique qui est à l'origine d'une augmentation de l'inflammation et donc du volume des POAN. Dans le modèle murin, on observe, quel que soit l'expérience, une variation du volume des OHN. Cette variation est également retrouvée en pathologie humaine, expliquant pourquoi certains patients sont symptomatiques alors que d'autres ne le sont pas. La symptomatologie clinique dépend du volume mais aussi de la localisation des POAN. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les OHN du modèle animal ne sont pas péri-articulaires mais intramusculaire. Nous n'expliquons pas bien ce phénomène et malgré un grand nombre de similarité histologique, nous préférons ici les différencier des POAN en terme de terminologie.

L'étude clinique conduite chez les patients TC en réanimation pose le problème du faible effectif de patients avec POAN (N=6) (Chapitre 3). Il se peut que certains résultats soient non significatifs à tort par manque d'effectif dans le groupe « cas » avec POAN. Une analyse multivariée n'a pas pu être faite pour les mêmes raisons. Le design rétrospectif est également une limite même si les dossiers cliniques de réanimation sont très complets.

L'étude BENTHOS, au design prospectif, va reprendre une grande partie des critères cliniques préalablement étudiés dans l'étude rétrospectives, notamment infectieux. Les données recueillies dans cette database permettront de confirmer les résultats obtenus mais aussi de préciser si les tendances retrouvées dans l'étude rétrospective se trouvent en lien avec la survenue de POAN. Enfin, un plus grand nombre de patients avec POAN permettrait de réaliser une analyse multivariée et ainsi, de différencier les facteurs identifiés comme étant en lien avec l'apparition de POAN et les facteurs confondants. Concernant l'infiltration, au site de développement de POAN, de dérivés cortisonés comme alternative d'un traitement antalgique, il faudrait maintenant réaliser une étude contrôlée, randomisée, versus placebo de façon à confirmer l'effet positif de l'infiltration de corticoïdes sur la douleur.

La partie recherche fondamentale a été réalisée de novembre 2015 à octobre 2016 dans le laboratoire du Pr Jean Pierre Levesque, responsable de l'unité " Stem Cell Biology Laboratory" (Cancer Care and Biology Program, Mater Research, University of Queensland, Woollongabba, Queensland, Australia) avec l'aide d'un financement du gouvernement australien (National Health and Medical Research Council). C'est au sein de cette équipe que le modèle murin développant des POAN après section médullaire et injection de cardiotoxine a été créé 3 ans plus tôt [221]. Une collaboration étroite se

poursuit depuis avec notamment la soumission courant 2019 de deux appels à projets auprès de l'Unité de Défense des Etats Unis (US DOD) et du gouvernement australien (National Health and Medical Research Council) qui permettront de financer l'étude BENTHOS. Cette collaboration est rendue possible grâce à un accord cadre, renouvelé tous les 3 ans, entre l'Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines et l'Université du Queensland. Le modèle murin a été importé par le Pr François Genêt dans l'équipe 3 de l'UMR1179 (UFR des Sciences de la Santé, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines). Cette unité collabore également avec une équipe française de l'UMRS-MD-1197 « Interactions entre les cellules souches et leurs niches en physiologie, cancérologie et dans la réparation tissulaire ». C'est une unité mixte de recherche INSERM, Université Paris 11 (Dr Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès) et ministère des Armées (Pr Sébastien Banzet). Depuis 5 ans, cette équipe analyse les POAN issus des résections chirurgicales réalisées par les chirurgiens orthopédistes de l'hôpital Raymond Poincaré. Le travail de nos trois équipes a conduit à des résultats majeurs déjà présenté dans ce manuscrit de thèse dont la mise en évidence d'une niche hématopoïétique ectopique pleinement fonctionnelle au sein des POAN et un rôle majeur des macrophages, de l'inflammation et de l'Oncostatine M dans la physiopathologie des POAN [3,221,249,264,325].

Sur le plan clinique, nous disposons à l'hôpital Raymond Poincaré de la plus grande série mondiale de patients opérés pour résection chirurgicale de POAN gênantes (545 patients, 784 chirurgies en juin 2018). Une dizaine d'études ont été publiées depuis la création de la base de données BANKHO en octobre 1993 dont les principaux résultats sont présentés dans l'introduction de ce manuscrit de thèse. La gestion des patients avec POAN chirurgicaux relève d'une prise en charge pluridisciplinaire de neuro-orthopédie constituée de médecins de médecine physique et de réadaptation, de chirurgiens orthopédistes, d'anesthésistes et rééducateurs. Le développement de la neuro-orthopédie sur ce site hospitalier permet depuis plus de 30 ans de prendre en charge les complications orthopédiques liées à une pathologie neurologique de patients vivants en France mais aussi à l'étranger. Ce concept de travail pluridisciplinaire va être matérialisé en novembre 2020 par la création du premier service de neuro-orthopédie sur l'hôpital Raymond Poincaré. Ce service proposera une prise en charge médicale et chirurgicale adaptées aux patients présentant des complications neuro-orthopédiques dont des POAN.

Enfin, le projet BENTHOS est ambitieux et requiert une bonne méthodologie, un financement, un accord éthique. Toutefois, le réseau hospitalier et universitaire actuel nous permet aujourd'hui d'établir un lien bidirectionnel entre la pathologie clinique et la recherche fondamentale. Cette collaboration paraît primordiale pour prétendre à une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques conduisant à la formation de POAN. L'étude BENTHOS est le fruit de cette recherche translationnelle et internationale. Nous espérons au travers de cette étude découvrir des facteurs cliniques et marqueurs biologiques clés dans la formation de POAN dont le but est double : 1/

établir un score de risque de survenue de POAN permettant de diagnostiquer les patients à risque le plus précocement possible ; 2/ élaborer à terme, des thérapeutiques ayant pour but de prévenir ou de guérir des POAN.

VII. Annexe



« Incidence des paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) dans une population de traumatisés crâniens et de blessés médullaires et marqueurs spécifiques du développement précoce de POAN »
« BENTHOS »

Version N°1-0 du 12/04/2019

Code projet : code promoteur/ N° IDRCB: 2019-A00949-48

Investigateur coordonnateur : **Dr Marjorie SALGA**
Service de Médecine Physique et de Réadaptation
Hôpital Raymond Poincaré
104 Bd Raymond Poincaré, 92380 GARCHES
Tél : 01.47.10.70.82
Courriel : marjorie.salga@aphp.fr

Responsable scientifique : **Pr François GENËT**
Service de Médecine Physique et de Réadaptation
Hôpital Raymond Poincaré
104 Bd Raymond Poincaré, 92380 GARCHES
Tél : 01.47.10.70.70
Courriel : francois.genet@aphp.fr

Promoteur : **Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP) et par délégation : Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation (DRCI)**
Hôpital Saint-Louis
1, avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris
Réfèrent projet DRCI-Siege: Prénom NOM
Courriel :

Structure chargée du suivi de la recherche : **Unité de Recherche Clinique (URC) Paris-Île-de-France-Ouest (URC-PO)**
Hôpital Ambroise Paré
9 avenue Charles de Gaulle, 92104 Boulogne cedex
Réfèrent projet DRCI-URC : Mme Yasmine DOMINGO
Courriel : nabila-yasmine.saidji@aphp.fr
Méthodologiste : Madalina JACOTA

Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation (DRCI)
Hôpital Saint Louis 75010 PARIS

Page de SIGNATURE D'UN PROTOCOLE de recherche

Code de la Recherche :

Titre : « Incidence des paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) dans une population de traumatisés crâniens et de blessés médullaires et marqueurs spécifiques du développement précoce de POAN_BENTHOS »

Version N°1-0 du 12/04/2019

La recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques en vigueur et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

L'investigateur coordonnateur :

Dr Marjorie SALGA
Service de Médecine Physique et de Réadaptation
Hôpital Raymond Poincaré
104 Bd Raymond Poincaré, 92380 GARCHES

Date :/...../.....

Signature :

Le promoteur

Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation
(DRCI)
Hôpital Saint Louis
1, avenue Claude Vellefaux, 75010 PARIS

Date :/...../.....

Signature :

TABLE DES MATIÈRES

1	RÉSUMÉ SYNOPTIQUE	163
2	JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE	167
2.1	ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES AU REGARD DE LA RECHERCHE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
2.2	HYPOTHESES DE LA RECHERCHE	168
2.3	DESCRIPTION DE LA POPULATION A ETUDIER ET JUSTIFICATION DE SON CHOIX.....	168
2.4	DESCRIPTION DES ACTES PRATIQUES OU PRODUITS UTILISES CONFORMEMENT A LEUR UTILISATION COURANTE.....	169
2.5	DESCRIPTION DES ACTES ET DES PROCEDURES AJOUTEES PAR LA RECHERCHE	169
2.6	RESUMÉ DES BENEFICES ET DES RISQUES PRÉVISIBLES ET CONNUS POUR LES PERSONNES SE PRÉTANT À LA RECHERCHE	169
3	OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	170
3.1	OBJECTIF PRINCIPAL DE LA RECHERCHE	170
3.2	OBJECTIFS SECONDAIRES DE LA RECHERCHE.....	170
4	CONCEPTION DE LA RECHERCHE	170
4.1	CRITERE D'EVALUATION PRINCIPAL.....	170
4.2	CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES	171
5	DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE	177
5.1	PLAN EXPERIMENTAL.....	177
5.2	NOMBRE DE CENTRES PARTICIPANTS.....	177
5.3	DESCRIPTION DES MESURES PRISES POUR REDUIRE ET EVITER LES BIAIS.....	177
5.4	CALENDRIER DE LA RECHERCHE.....	178
5.5	VISITE DE PRE-INCLUSION.....	179
5.6	VISITE D'INCLUSION.....	179
5.7	VISITES DE SUIVI DE LA RECHERCHE.....	179
5.8	VISITE ANNEXE CAR NON SYSTEMATIQUE	181
5.9	TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES RECUEILLIES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
5.10	SCHEMA RECAPITULATIF DE LA CHRONOLOGIE DE LA RECHERCHE	183
5.11	DISTINCTION SOIN-RECHERCHE	183
5.12	COLLECTION BIOLOGIQUE	184
6	SELECTION	185
6.1	CRITERES D'INCLUSION.....	185
6.2	CRITERES DE NON INCLUSION	186
6.3	MODALITES DE RECRUTEMENT.....	186
7	REGLES D'ARRET	187
7.1	CRITERES ET MODALITES D'ARRET PREMATURE DE LA PARTICIPATION A LA RECHERCHE D'UN SUJET.....	187
8	VIGILANCE	188
9	GESTION DES DONNEES	188
9.1	MODALITES DE RECUEIL DES DONNEES	188
9.2	IDENTIFICATION DES DONNEES RECUEILLIES DIRECTEMENT DANS LES CRF QUI SERONT CONSIDEREES COMME DONNEES-SOURCE	188
9.3	DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE.....	188
9.4	ACCES AUX DONNEES	189
9.5	TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES	190
9.6	PROPRIETE DES DONNEES	191
10	ASPECTS STATISTIQUES	191
10.1	DESCRIPTION DE LA POPULATION	191
10.2	ANALYSE PRINCIPALE.....	191
10.3	ANALYSES SECONDAIRES	191
10.4	JUSTIFICATION DU NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRES.....	192
11	CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE	192

11.1	<u>ORGANISATION GENERALE</u>	192
11.2	<u>CAHIER D'OBSERVATION</u>	193
11.3	<u>GESTION DES NON CONFORMITES</u>	193
11.4	<u>AUDIT</u>	194
11.5	<u>ENGAGEMENT DE RESPONSABILITES DE L'INVESTIGATEUR PRINCIPAL</u>	194
12	<u>ASPECTS ETHIQUES ET LEGAUX</u>	194
12.1	<u>MODALITES D'INFORMATION ET DE RECUEIL DU CONSENTEMENT DES PERSONNES SE PRETANT A LA RECHERCHE</u>	195
12.2	<u>OBLIGATIONS LEGALES</u>	195
12.3	<u>DEMANDE D'AVIS AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES CPP</u>	195
12.4	<u>INFORMATION DE L'ANSM</u>	195
12.5	<u>ENGAGEMENT DE CONFORMITE A LA « METHODOLOGIE DE REFERENCE » MR 001</u>	195
12.6	<u>MODIFICATIONS DE LA RECHERCHE</u>	196
13	<u>FINANCEMENT ET ASSURANCE</u>	196
13.1	<u>SOURCE DE FINANCEMENT</u>	196
13.2	<u>ASSURANCE</u>	196
14	<u>REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION</u>	196
14.1	<u>MENTION DE L’AFFILIATION DE L’AP-HP POUR LES PROJETS PROMUS PAR L’AP-HP</u>	197
14.2	<u>MENTION DU PROMOTEUR AP-HP (DRCD) DANS LES "ACKNOWLEDGMENTS" DU MANUSCRIT</u>	197
14.3	<u>MENTION DU FINANCEUR DANS LES "ACKNOWLEDGMENTS" DU MANUSCRIT</u>	197
15	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	198
16	<u>LISTE DES ADDENDA</u>	198
17	<u>LISTE DES INVESTIGATEURS</u>	198
18	<u>QUESTIONNAIRE OU ECHELLE UTILISES</u>	199
18.1	<u>ANNEXE 0: DONNEES RECUEILLIES AU COURS DES VISITES</u>	200
18.2	<u>SCORE AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION (ASIA)</u>	214
18.3	<u>ECHELLE D'ASHWORTH MODIFIEE</u>	215
18.4	<u>INFECTIONS PENDANT LE SEJOUR EN REANIMATION</u>	216
18.5	<u>TEST DE GALVESTON ORIENTATION AND AMNESIA TEST (GOAT)</u>	217
18.6	<u>GLASGOW OUTCOME SCALE AND EXTENDED GLASGOW OUTCOME SCALE (INTERVIEW). SOURCE : COLLEGE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION</u>	218
18.7	218	
18.6	<u>EXAMEN DES AMPLITUDES PASSIVES</u>	221
18.7	<u>INDEX DE BARTHEL</u>	222

1. RÉSUMÉ SYNOPTIQUE

Titre complet	Incidence des paraostéarthropathies neurogènes (POAN) dans une population de traumatisés crâniens et de blessés médullaires et marqueurs spécifiques du développement précoce de POAN
Acronyme/référence	BENTHOS
Investigateur coordonnateur	Dr Marjorie SALGA Service de Médecine Physique et de Réadaptation Hôpital Raymond Poincaré Tél : 01.47.10.70.82 Courriel : marjorie.salga@aphp.fr
Responsable scientifique	Pr François GENÊT Service de Médecine Physique et de Réadaptation Hôpital Raymond Poincaré Tél : 01.47.10.70.70 Courriel : francois.genet@aphp.fr
Promoteur	Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Justification scientifique	Les paraostéarthropathies neurogènes sont des formations osseuses péri-articulaires pouvant survenir dans les suites d'une lésion neurologique centrale. Leur apparition limite la rééducation et les capacités de récupération. Les POAN sont parfois à l'origine de complications (douleur, raideur articulaire, compression vasculaire et nerveuse, escarre) chez des patients déjà porteurs de lourdes séquelles neurologiques grevant le pronostic fonctionnel. De nombreux travaux de recherche clinique ont été réalisés au sein de notre équipe. Par la suite est née une collaboration avec des équipes de recherche fondamentale (Pr Levesque, Pr Le Bousse Kerdilès, Pr Banzet, Pr Genêt) permettant des travaux translationnels homme-animal. L'application clinique des découvertes récentes émanant de la recherche permet aujourd'hui de lancer la toute première étude prospective sur les paraostéarthropathies neurogènes.
Objectif et critère d'évaluation principal	Objectif principal : Déterminer l'incidence de survenue de POAN dans les 9 mois suivant un traumatisme crânien et/ou une lésion médullaire. Critère d'évaluation principal : Survenue de POAN dans les 9 mois suivant un traumatisme crânien et/ou une lésion médullaire
Objectifs et critères d'évaluation secondaires	Objectifs secondaires : <ul style="list-style-type: none"> • Déterminer l'incidence du développement de POAN dans les 9 mois suivant un traumatisme crânien, • Déterminer l'incidence du développement de POAN dans les 9 mois suivant une lésion médullaire, • Déterminer s'il existe une association entre les paramètres biologiques issus du sang/plasma, des urines et du liquide céphalo-rachidien dans les 15 jours suivant une lésion neurologique centrale et la survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme, • Déterminer s'il existe une association entre des paramètres cliniques identifiés dans les 9 mois suivant l'accident neurologique et la survenue de POAN dans l'année après le traumatisme, • Créer un score de risque clinico-biologique de survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme, • Calculer les performances pronostiques (de survenue de POAN

	<p>dans l'année après le traumatisme) pour les paramètres biologiques statistiquement associés à la survenue de POAN et pour le score de risque.</p> <p>Critères d'évaluation secondaires :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Survenue de POAN dans les 9 mois suivant un traumatisme crânien • Survenue de POAN dans les 9 mois suivant une lésion médullaire • Résultats des dosages biologiques des sujets dans les 15 jours suivant une lésion neurologique centrale • Caractéristiques cliniques des sujets dans les 9 mois suivant une lésion neurologique centrale • Score de risque clinico-biologique de survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme • Performances pronostiques (de survenue de POAN dans l'année après le traumatisme) pour les paramètres biologiques statistiquement associés à la survenue de POAN et pour le score de risque
Schéma expérimental	Etude observationnelle (cohorte prospective)
Population concernée	Patients traumatisés crâniens ou médullaires à leur arrivée en réanimation
Critères d'inclusion	<ul style="list-style-type: none"> • Homme ou Femme > 18 ans • Traumatisme crânien avec score de Glasgow initial < 8 • ou traumatisme crânien avec score de Glasgow initial entre 8 et 14 associé à un « Injury Severity Score » (ISS) > 15 et une chirurgie dans les 24 heures suivant l'admission • Lésion médullaire traumatique complète (para/tétraplégie initiale) • Accident datant de moins de 48 heures • Consentement éclairé signé par le patient ou un proche
Critères de non inclusion	<ul style="list-style-type: none"> • Age < 18 ans, • Choc hémorragique ou transfusion sanguine supérieure ou égale à 4 culots globulaires dans les 6 heures suivant le traumatisme (compter également les culots pré-hospitaliers ou du premier hôpital), • Suivi impossible sur un an, • Patient n'habitant pas en région parisienne, • Femme enceinte ou allaitante, • Patient sous tutelle ou curatelle, • Non affiliation à un régime de sécurité sociale ou CMU.
Actes ou Produit faisant l'objet de la recherche	<ul style="list-style-type: none"> • Dosages biologiques (sang, urines, liquide céphalorachidien), • Recueil d'informations cliniques, • Imagerie en cas de suspicion clinique de POAN.
Autres actes ou procédures ajoutés par la recherche	<ul style="list-style-type: none"> • Tubes de sang supplémentaires, • Consultations de suivi supplémentaires.
Bénéfices attendus pour les participants et pour la société	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi rapproché dans les 9 mois suivant l'accident neurologique, • Détecter précocement les patients à risque de développer des POAN pour les prendre en charge avant la survenue de complications, • Dépister d'autres anomalies liées au handicap (déformations neuro-orthopédiques, escarres...) et orienter vers une structure experte afin de permettre des soins adaptés.
Risques et contraintes minimales ajoutés par la recherche	Prélèvements de liquides biologiques et recueils de données cliniques réalisés en supplément par rapport à ce qui est fait en

	routine
Déroulement pratique	<p><u>J0 à J+2</u> : Inclusion</p> <p><u>J+2</u> : Premier prélèvement de liquides biologiques (sang/plasma, urines, liquide céphalorachidien) + recueil d'informations cliniques</p> <p><u>J+8</u> : Second prélèvement de liquides biologiques (sang/plasma, urines, liquide céphalorachidien) + recueil d'informations cliniques</p> <p><u>J+15</u> : Troisième prélèvement de liquides biologiques (sang/plasma, urines, liquide céphalorachidien) + recueil d'informations cliniques</p> <p><u>M+1</u> : Recueil d'informations cliniques</p> <p><u>M+2</u> : Recueil d'informations cliniques</p> <p><u>M+3</u> : Recueil d'informations cliniques</p> <p><u>M+6</u> : Recueil d'informations cliniques</p> <p><u>M+9</u> : Recueil d'informations cliniques</p>
Nombre de sujets sélectionnés	118 sujets
Nombre de centres	<p><u>Centres recruteurs :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Service Réanimation chirurgicale polyvalente, Pr Catherine PAUGAM-BURTZ, CHU Beaujon, 100 Boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, France. • Service de Chirurgie Orthopédique (Pr Marc Antoine ROUSSEAU), CHU Beaujon, 100 Boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy, France. • Service Réanimation (Pr Romain PIRRACCHIO), Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 Rue Leblanc, 75015 Paris, France. • Service de Chirurgie Orthopédique (Pr Pierre GUIGUI), Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 Rue Leblanc, 75015 Paris, France. <p><u>Centres non recruteurs :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Service de Médecine Physique et de Réadaptation (Pr AZOUVI), CHU R. Poincaré, 104 Bd R. Poincaré 92380 Garches, France. Pour consultation de suivi et réalisation des examens radiologiques. • Centre de ressources biologiques de Bichat (CRB) (Hôpital Bichat, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris) sous la responsabilité de Mme HUART et Dr TUBIANA • Unité de recherche UMR-S/MD1197, IRBA-CTSA, Hôpital Percy, 1 Rue du Lieutenant Raoul Batany, 92190 Clamart, France • Unité de recherche END:ICAP U1179 INSERM, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR des Sciences de la Santé–Simone Veil, Montigny le Bretonneux, France
Calendrier de la recherche	<p>Durée d'inclusion : 12 mois</p> <p>Durée de participation : 9 mois</p> <p>Durée totale : 21 mois</p> <p>Durée de conservation de la sérothèque : 2 ans</p> <p>Durée d'interdiction de participation à une autre recherche et justification : aucune interdiction</p>

Nombre d'inclusions prévues par centre et par mois	2,5
Analyse statistique	<p>Calcul de l'incidence des POAN dans l'année après l'inclusion, avec son IC 95%, parmi les patients inclus dans l'étude séparément dans les deux groupes : traumatisme crânien et lésion médullaire à l'inclusion.</p> <p>Régressions logistiques univariées, puis multivariées pour expliquer la survenue de POAN par les paramètres cliniques et biologiques d'intérêt à l'inclusion.</p> <p>Création d'un score de risque de survenue de POAN sur la base du modèle multivarié.</p> <p>Modèles de régression logistique multiniveau pour expliquer la survenue de POAN par l'évolution des paramètres biologiques dans le temps.</p> <p>Calculs de seuils et des performances pronostiques pour chaque paramètre biologique avec une association statistiquement significative avec la survenue de POAN, ainsi que pour le score</p>
Source de financement	US DOD

2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE

2.1 ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES AU REGARD DE LA RECHERCHE

- Sur la pathologie

Les paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) sont des formations osseuses ectopiques de localisation péri-articulaire mais toujours extra-capsulaire. Ces ossifications suivent un processus de maturation d'os lamellaire constitué d'ostéoblastes, ostéoclastes et moelle osseuse hématopoïétique [3]. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans leur développement restent encore obscurs. Ils s'observent chez 20 à 29% des patients avec lésion médullaire et 5 à 20% des traumatisés crâniens [140][91]. Ils se développent en zone paralysée [60], préférentiellement autour des hanches, coudes, genoux et épaules [57]. Le diagnostic est souvent tardif et se fait lors de la survenue de complications chez les patients souffrant d'une perte de sensibilité ou d'une altération des possibilités de communication [57]. Les POAN sont à l'origine de douleur, raideur articulaire voire ankylose, compression vasculaire ou nerveuse ou bien escarre. Leur apparition limite les capacités de rééducation et de récupération chez des patients déjà porteurs de lourdes séquelles neurologiques, grevant ainsi le pronostic fonctionnel [306]. La suspicion clinique de POAN est confirmée par les examens d'imagerie [79]. Le seul traitement radical, à l'heure actuelle, reste la chirurgie d'exérèse.

- Sur les stratégies/ procédures de référence

Nous avons développé sur l'hôpital Raymond Poincaré, un axe de recherche sur les complications osseuses après lésions neurologiques centrales incluant les POAN. Ce projet est intégré à l'équipe 3, UMR 1179, Endi:icap, Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines. En premier lieu, nous avons mis à jour et développé une base de données permettant de recenser tous les patients opérés de POAN par l'équipe du Dr Philippe DENORMANDIE depuis 1993. L'expertise clinique liée aux consultations pluridisciplinaires spécialisées a permis de réaliser une analyse épidémiologique de cette base de données dès 2009. Actuellement nous bénéficions de la plus grande série de POAN opérées publiée (570) et le nombre d'exérèse de POAN se porte aujourd'hui à 884. La description et exploitation de la base de données « BANKHO » a permis de mieux identifier la population de patients à risque et d'optimiser leur prise en charge [57][306][72][112][313][117][326][327] [312] [328].

Un axe de recherche fondamentale sur du tissu osseux humain a ensuite vu le jour. Bénéficiant sur site d'un grand nombre de chirurgies d'excision, une collection des déchets opératoires de ces pièces osseuses hétérotopiques a ensuite été collectée pour analyse histologique. Ce travail a été développé en collaboration avec l'unité INSERM UMR-S/MD1197 de l'hôpital Paul Brousse (Pr Marie-Caroline LE BOUSSE-KERDILES) et les laboratoires de recherche et de biologie osseuse du Service de Santé des Armées et de l'IRBA (Pr Jean-Jacques LATAILLADE, Drs. Jean-Marc COLOMBET et Xavier HOLY). Ainsi, en 2011, un axe de recherche fondamentale sur du tissu d'ostéome humain a été

développé. Torossian et al.[3], de l'Inserm UMR-S/MD1197 ont défini les caractéristiques des POAN excisées.

La mise au point d'un modèle expérimental dans lequel des ossifications hétérotopiques se développent après lésion du système nerveux central paraissait essentielle pour étudier les mécanismes intervenant dans la genèse et le développement des POAN. Genêt et al. [221], ont mis au point le premier modèle murin de POAN dans le laboratoire du Pr Levesque (Stem Cell Biology Laboratory, Cancer Care and Biology Program, Mater Research – The University of Queensland, Woolloongabba, Queensland, Australia). La formation de POAN nécessite la combinaison d'une section médullaire chirurgicale et d'un dommage musculaire en zone sous lésionnelle créé par l'injection de cardiotoxine, une myotoxineprotéique. Ce modèle robuste reproduit un grand nombre de caractéristiques cliniques et physiopathologiques similaires à celles de la pathologie humaine et ce, en l'absence de manipulation génétique ou d'injection intramusculaire de BMP. L'exploitation de ce modèle a donné lieu à plusieurs publications [249][325]. Les travaux actuellement menés ont permis d'identifier certaines cytokines inflammatoires, le système nerveux autonome ou encore des protéines libérées lors de lyses cellulaires ou par les plaquettes comme intervenant dans le métabolisme osseux et potentiellement dans la formation de POAN [264].

2.2 HYPOTHESES DE LA RECHERCHE

En se basant sur les résultats des travaux collaboratifs et translationnels (homme-animal), nous souhaitons mener la première étude prospective qui permettrait :

- i) D'évaluer l'incidence des POAN (suspicion clinique et confirmation radiologique). Le caractère prospectif de ce recueil de données cliniques permettra de s'affranchir des biais imputés aux études rétrospectives menées jusqu'à présent.
- ii) De détecter précocement les patients à risque de développer des POAN, grâce à des biomarqueurs et paramètres cliniques spécifiques. Un diagnostic précoce pourrait permettre de prévenir la survenue de complications et le retentissement fonctionnel liés au POAN.

À terme, nous souhaiterions déterminer des molécules clés dans le mécanisme conduisant au développement de POAN qui pourraient faire l'objet de cibles pharmacologiques dans le cadre d'un traitement préventif ou curatif.

2.2 DESCRIPTION DE LA POPULATION A ETUDIER ET JUSTIFICATION DE SON CHOIX

L'étude concerne tous les patients avec traumatisme crânien et/ou traumatisme médullaire justifiant d'une prise en charge en réanimation. Selon les données épidémiologiques, ces deux populations sont les plus sujettes au développement des POAN. Nous avons choisi de restreindre notre

population aux patients les plus à risque de présenter une POAN dans les suites de l'accident neurologique central dans le but de voir apparaître 2 populations à la fin de notre étude : une population avec POAN et une population sans POAN que nous pourrons alors comparer.

2.3 DESCRIPTION DES ACTES PRATIQUES OU PRODUITS UTILISES CONFORMEMENT A LEUR UTILISATION COURANTE

Les prélèvements de liquides biologiques (sang/plasma, urine, liquide céphalorachidien) seront effectués lors des prélèvements de routines. Aucun prélèvement ne sera réalisé uniquement dans le cadre de ce protocole.

Le recueil de données cliniques est réalisé tout au long du séjour du patient dans le service de réanimation.

La consultation à 6 mois est habituellement réalisée dans les services de rééducation disposant d'un service de consultations.

2.4 DESCRIPTION DES ACTES ET DES PROCEDURES AJOUTEES PAR LA RECHERCHE

Les prélèvements de liquides biologiques (sang/plasma, urines, liquide céphalorachidien) seront réalisés en plus des tubes habituels et envoyés au laboratoire du Centre de Ressources Biologique (CRB) de Bichat ou de l'HEGP pour être techniqués et stockés.

Le recueil de données cliniques à la sortie du service de réanimation se fera lors de consultations de suivi spécifiquement dédiées à l'étude.

2.5 RESUMÉ DES BENEFICES ET DES RISQUES PRÉVISIBLES ET CONNUS POUR LES PERSONNES SE PRÊTANT À LA RECHERCHE

Les patients inclus dans cette étude bénéficieront d'un suivi clinique rapproché sur l'année suivant leur inclusion. La suspicion de POAN débouchera sur la réalisation d'une imagerie diagnostique et une prise en charge spécifique si le diagnostic est avéré. Ce suivi permettra également de dépister d'autres anomalies liées au handicap (déformations neuro-orthopédiques, escarres...). Le patient sera alors pris en charge ou orienté vers une autre structure experte afin de permettre des soins adaptés.

Les risques prévisibles pour les patients inclus dans cette étude pourraient être liés :

- Aux prélèvements supplémentaires de liquides biologiques effectués pour la recherche. C'est pour cela que les patients en choc hémorragique ou ayant reçu plus de 4 culots globulaires dans les 6 heures suivant le traumatisme seront logiquement exclus de cette étude. On prélèvera seulement 2 tubes supplémentaires de 5 millilitres chacun soit 10 millilitres. Nous avons fait le choix d'espacer

les prélèvements d'une semaine de façon à réduire la fréquence et le volume de sang prélevé pour la recherche.

- Au prélèvement sanguin qui peut entraîner une sensation désagréable transitoire au moment de la piqûre, ainsi qu'un hématome au point de ponction.
- À la contrainte due aux consultations de suivi pour recueil des données cliniques. Dans le but de réduire les déplacements de patients et le nombre de perdus de vue, il était important de restreindre notre population aux sujets vivant en région parisienne. Par ailleurs, les recueils de données seront réalisés sur les lieux d'hospitalisation du patient tant que celui-ci sera hospitalisé. Une fois rentré au domicile ou en institution, le patient sera vu en consultation de suivi dans le service de médecine physique et de réadaptation sur le site de l'hôpital Raymond Poincaré.

3. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

3.1 OBJECTIF PRINCIPAL DE LA RECHERCHE

L'objectif principal de cette étude est de déterminer l'incidence du développement de POAN dans les 9 mois suivant l'accident neurologique de notre population.

3.2 OBJECTIFS SECONDAIRES DE LA RECHERCHE

- Déterminer l'incidence du développement de POAN dans les 9 mois suivant un traumatisme crânien,
- Déterminer l'incidence du développement de POAN dans les 9 mois suivant une lésion médullaire,
- Déterminer s'il existe une association entre des paramètres biologiques issus du sang/plasma, des urines et du liquide céphalo-rachidien dans les 15 jours suivant une lésion neurologique centrale et la survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme,
- Identifier des facteurs de risques cliniques robustes, identifiés dans les 9 mois suivant l'atteinte neurologique et pouvant être impliqués dans la survenue de POAN,
- Créer un score de risque clinico-biologique de survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme,
- Calculer les performances pronostiques (de survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme) pour les paramètres biologiques statistiquement associés à la survenue de POAN et pour le score de risque.

4. CONCEPTION DE LA RECHERCHE

4.1 CRITERE D'EVALUATION PRINCIPAL

Le critère d'évaluation principal est la survenue de POAN au cours des 9 mois suivant l'accident neurologique.

La suspicion clinique de POAN repose sur la présence d'un ou plusieurs symptômes suivants [140] [10] :

- Liés à la POAN elle-même : signes inflammatoires locaux, masse palpable péri-articulaire, raideur et/ou douleur articulaires (mécaniques, inflammatoires ou mixtes),
- Complications secondaires au développement de la POAN : compression vasculaire, compression nerveuse, escarre, ankylose articulaire.

En cas de suspicion clinique de POAN, une imagerie sera demandée afin de confirmer le diagnostic. L'examen sera effectué par un médecin radiologue des hôpitaux participants (échographie en réanimation ou angioscanner avec reconstruction 3 dimensions en radiologie). Chez les sujets encore hospitalisés en réanimation, l'échographie au lit du patient est à privilégier afin d'éviter les transports chez les patients lourds et dépendants. Le diagnostic repose sur l'identification à la phase précoce de développement de POAN, d'un œdème et hypervascularisation dans un muscle péri-articulaire et à un stade plus avancé, d'une masse hyperéchogène au sein d'un muscle hétérogène de localisation péri-articulaire [329]. Elle a pour inconvénient d'être opérateur dépendant et de ne pas permettre une caractérisation correcte des POAN et leur rapport avec les structures adjacentes. Dans les autres cas, l'angioscanner avec reconstruction 3 dimensions sera demandé car aujourd'hui, cet examen est considéré comme l'imagerie de référence. Selon le degré de maturation de la POAN, le diagnostic scannographique se fait précocement en présence d'îlots musculaires ossifiés au sein d'un muscle hétérogène et œdémateux [330]. Avec le temps et la maturation, le POAN s'ossifie progressivement avec la confluence des différents îlots qui s'organisent en une véritable masse osseuse plus ou moins volumineuse, hétérogène et pouvant fusionner avec les os environnants. Au-delà du diagnostic, le scanner permet également de préciser les caractéristiques des POAN (taille, localisation, volume, rapport avec structures vasculaire et nerveuse), d'évaluer le risque de complication (démérialisation osseuse, lésions intra-articulaires) et permet au chirurgien de trouver un plan de clivage et une voie d'abord avant la chirurgie [79].

4.2 CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES

- Survenue de POAN dans les 9 mois suivant un traumatisme crânien.
- Survenue de POAN dans les 9 mois suivant une lésion médullaire.
- Résultats des dosages biologiques des sujets dans les 15 jours suivant une lésion neurologique centrale.
- Caractéristiques cliniques des sujets dans les 9 mois suivant une lésion neurologique centrale.
- Score de risque clinico-biologique de survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme.

- Performances pronostiques (de survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme) pour les paramètres biologiques statistiquement associés à la survenue de POAN et pour le score de risque.

Liste des liquides biologiques	Molécules	Tubes supplémentaires	Stockage au CRB	Méthode de mesure	Laboratoire effectuant la mesure
Sang périphérique / plasma	Numération, formule sanguine, plaquettes, lactates, PO2, PCO2, phosphatases alcalines, calcémie, protéines, phosphorémie, créatine phospho-kinase, ASAT, fibrinogène	non	non	Examens courants réalisés par les laboratoires	Laboratoires de biochimie et hématologie des hôpitaux Beaujon et HEGP
	OSM, IL 1 α et IL1 β , Il-31, LIF, FGF23, BDNF, GABA Endotoxines, CXCL12 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, TGF-beta ATP, HMGB1, S100A8/9 Leptine, cortisol, ACTH, normetadrenaline, metadrenaline Calcitonine et osteocalcine Glutamate	oui	oui	ELISA et analyse multiplex réalisés pour la recherche	CRB Bichat et HEGP
Urines	Calcémie, phosphorémie, cortisol, métanéphrines, metadrenaline et acide vanylmandélique, PGE2	oui	oui	ELISA et analyse multiplex réalisés pour la recherche	CRB Bichat et HEGP
Liquide céphalo-rachidien	chlore, glycorachie, protéines	non	non	Examens courants réalisés par les laboratoires	Laboratoires de biochimie et hématologie des hôpitaux Beaujon et HEGP
	OSM, IL 1 α et IL1 β , Il-31, LIF, FGF23, BDNF, GABA	oui	oui	ELISA et analyse multiplex réalisés	CRB Bichat et HEGP

	Endotoxines, CXCL12 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, TGF-beta ATP, HMGB1, S100A8/9 Leptine, cortisol, ACTH, normetadrenaline, metadrenaline Calcitonine et osteocalcine Glutamate			pour la recherche	
--	--	--	--	-------------------	--

Les dosages s'effectueront :

- Pour le sang/plasma, les urines et le LCR, à 3 reprises au cours du séjour en réanimation,
 - Dans les 48 premières heures suivant l'arrivée du patient afin d'éviter les prélèvements la nuit et le dimanche pendant les heures de fermetures du CRB,
 - J+8 après le premier prélèvement,
 - J+15 après le premier prélèvement ou le jour de la sortie de réanimation si avant le 15ème jour.

- Pour le LCR, les prélèvements se feront au cours d'une procédure de traitement avec accès direct (en intention de traiter). Aucun prélèvement ne sera réalisé uniquement dans le cadre de ce protocole.
 - Pour les patients traumatisés crâniens, les prélèvements seront effectués depuis les dérivations ventriculaires externes par les IDE ou éventuellement par le neurochirurgien en cas de neurochirurgie.
 - Pour les patients traumatisés médullaires, les prélèvements se feront au bloc opératoire lors de la chirurgie rachidienne par l'IDE ou le chirurgien, si celle-ci est indiquée.
 - Pour les 2 populations, un recueil de LCR pourra se faire lors d'une ponction lombaire réalisée par les médecins, seulement si indiquée.

- Caractéristiques cliniques des sujets dans l'année suivant une lésion neurologique centrale
 - **Visite à J+2** (+/-2 jours) de l'inclusion du patient (*cf Annexe 0*):
 - Date de l'accident
 - Données patients : date de naissance, sexe, poids, taille, consommation de tabac, consommation d'alcool, origine ethnique (Remarque : les sujets à peau noires sont considérés comme étant plus à risque de développer des POA après implantation de

prothèse totale de hanche ou fractures acétabulaires ; ce sur-risque n'a jamais été montré pour les POA neurologiques [331][332]).

- Données SMUR : Score Glasgow initial, perte de connaissance initiale, polytraumatisme (oui/non), mécanisme de l'accident (traumabase), désincarcération (traumabase), écrasé-projeté (traumabase), inhalation pulmonaire lors de l'intubation, arrêt cardiorespiratoire
- Lésions neurologiques : localisation des lésions cérébrales et/ou médullaires, type de lésions, lésions extra-cérébrales, fracture du crâne et ou du rachis, engagements, évacuation hématome, dérivation ventriculaire externe (traumabase), Abbreviated Injury Scale (AIS) head, American Spinal Injury Association score (ASIA) (*Annexe 1*)
- Lésions autres organes : Traumatisme musculaire, Fractures, Luxations, AIS Membres, AIS Colonne Vertébrale, Traumatisme thoracique, AIS Thorax, Traumatisme pelvien, Traumatisme abdominal, AIS Abdomen, Traumatisme facial, AIS Tête
- AIS total
- Chirurgie rachidienne de décompression médullaire

○ **Visite à J+8, J+15 et le jour de départ du service de réanimation (+/-2 jours) (cf Annexe 0)**

:

- Thérapeutiques utilisées : sédatifs pour neuro-protection, sédatifs pour agitation, curares, drogues vasoactives, corticoïdes, circulation extra corporelle, membrane d'oxygénation, exacyl, anti-épileptiques, anti-dépresseurs, dialyse, antibiotiques.
- Statut neurologique : Coma, dysautonomie, déficits neurologiques initiaux cognitif, Orientation dans le temps et l'espace, déficit moteur (complet/incomplet/pas de déficit), score ASIA, déficit moteur, commande motrice, choc spinal, échelle d'Ashworth modifiée de l'ensemble des groupes musculaires présents autour des articulations potentiellement concernées par les POAN (*Annexe 2*), aggravation neurologique secondaire, hypertension intracrânienne avec pression intracrânienne > 20 mmHg
- Statut infectieux (*Annexe 3*): Nombre d'infections pulmonaires, urinaires, cutanées/sur cathéter, méningées, ostéoarticulaires et autres au cours du séjour, sévérité pour chaque infection, nom des bactéries identifiées pour chaque infection
- Statut respiratoire : date de l'extubation, date de la trachéotomie, date de sevrage de la ventilation mécanique, syndrome de détresse respiratoire aigüe (traumabase)
- Statut inflammatoire : escarres, événement thromboembolique
- Kinésithérapie : kinésithérapie respiratoire, mobilisation passive des 4 membres dans l'ensemble des secteurs articulaires, installation au fauteuil, verticalisation sur plan.

○ **Visite le jour de sortie du service de réanimation, complément d'informations (+/-2 jours) (cf Annexe 0):**

- Date de départ du service de réanimation
 - Service d'aval
 - Examen neurologique : orientation dans le temps et espace, Galveston Orientation and Amnesia Test (GOAT) (*Annexe 4*), Glasgow outcome scale – extended (GOS-E), Examen cognitif, Examen moteur, déficit moteur, commande motrice, échelle d'Ashworth modifiée (*Annexe 2*), autres déficiences, agitation, score ASIA
 - Alimentation : Gastrostomie, date de retrait de la sonde naso-gastrique, date de la première prise alimentaire
 - Examen articulaire : amplitudes passives des hanches, genoux, coudes, épaules.
- **Visites M+1, M+2, M+3, M+6, M+9** (+/- 7 jours) depuis la visite d'inclusion (*cf Annexe 0*):
- Date de la consultation
 - Lieu du RDV
 - Date du retour au domicile
 - Examen neurologique : orientation dans le temps et espace, Galveston Orientation and Amnesia Test (GOAT) (*Annexe 4*), Glasgow outcome scale – extended (GOS-E), Examen cognitif, Examen moteur, déficit moteur, commande motrice, échelle d'Ashworth modifiée (*Annexe 2*), autres déficiences, agitation, score ASIA
 - Examen articulaire : amplitudes passives des hanches, genoux, coudes, épaules (*Annexe 6*)
 - Thérapeutiques utilisées : sédatifs pour agitation, anti-inflammatoires, anti-épileptiques, anti-dépresseurs, antibiotiques.
 - Statut infectieux (*Annexe 3*): Nombre d'infections pulmonaires, urinaires, cutanées et autres, sévérité pour chaque infection, nom des bactéries identifiées pour chaque infection
 - Statut respiratoire : date de sevrage de la trachéotomie, syndrome de détresse respiratoire aigüe
 - Statut inflammatoire : escarres, événement thromboembolique
 - Kinésithérapie : kinésithérapie respiratoire, mobilisation passive des 4 membres dans l'ensemble des secteurs articulaires, installation au fauteuil, verticalisation sur plan.
- Un examen radiologique (échographie ou angioscanner articulaire) sera effectué uniquement en cas de suspicion clinique de POAN, comme en pratique courante. L'examen sera effectué par un médecin radiologue des centres participants (échographie en réanimation ou angioscanner avec reconstruction 3 dimensions en radiologie).
- Calcul des performances pronostiques (de survenue de POAN dans les 9 mois après le traumatisme) pour les paramètres biologiques statistiquement associés à la survenue de POAN et pour le score de risque.

5. DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE

5.1 PLAN EXPERIMENTAL

Il s'agit d'une étude observationnelle (cohorte prospective). Dans le respect des recommandations STARD ([http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard/;](http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard/)), pour les dosages biologiques rajoutés pour la recherche, la réalisation des dosages et l'interprétation des résultats seront réalisés indépendamment du diagnostic de POAN.

5.2 NOMBRE DE CENTRES PARTICIPANTS

Il s'agit d'une recherche multicentrique comprenant 4 centres recruteurs (AP-HP) et 4 centres participants (non recruteurs).

- **Centres recruteurs :**

- Service Réanimation Chirurgicale Polyvalente (Pr Catherine PAUGAM-BURTZ), CHU Beaujon, 100 Boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy, France.
- Service de Chirurgie Orthopédique (Pr Marc Antoine ROUSSEAU), CHU Beaujon, 100 Boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy, France.
- Service Réanimation (Pr Romain PIRRACCHIO), Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 Rue Leblanc, 75015 Paris, France.
- Service de Chirurgie Orthopédique (Pr Pierre GUIGUI), Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 Rue Leblanc, 75015 Paris, France.

- **Centres participants (non recruteurs) :**

- Service de Médecine Physique et de Réadaptation (Pr AZOUVI), CHU R. Poincaré, 104 Bd R. Poincaré 92380 Garches, France. Pour consultation de suivi et réalisation des examens radiologiques.
- Centre de ressources biologiques de Bichat (CRB) (Hôpital Bichat, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris) sous la responsabilité de Mme Huart et Dr Tubiana.
- Unité de recherche UMR-S/MD1197, IRBA-CTSA, Hôpital Percy, 1 Rue du Lieutenant Raoul Batany, 92190 Clamart, France
- Unité de recherche END:ICAP U1179 INSERM, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR des Sciences de la Santé-Simone Veil, Montigny le Bretonneux, France

5.3 DESCRIPTION DES MESURES PRISES POUR REDUIRE ET EVITER LES BIAIS

- Identification des sujets

Dans le cadre de cette recherche, les sujets seront identifiés de la façon suivante :

n° centre (3 positions numériques) – n°ordre de sélection de la personne dans le centre (4 positions numériques) - initiale nom - initiale prénom (AAA-BB)

Cette référence est unique et sera conservée pour toute la durée de la recherche.

Personnes dont le consentement est sollicité	Qui informe et recueille le consentement de la personne	A quel moment la personne est informée	A quel moment le consentement de la personne est recueilli
<ul style="list-style-type: none"> • <u>La personne de confiance</u> pour les patients traumatisés crâniens et traumatisés médullaires dans l'incapacité de consentir (coma) • <u>Consentement de poursuite auprès du patient dès que possible</u> • <u>Le patient</u> traumatisé médullaire conscient à son arrivée en réanimation et en capacité de consentir 	<p>Médecin déclaré et formé à la recherche :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Réanimateur • Chirurgien orthopédiste • Médecin de médecine physique et de réadaptation (MPR) 	<p>Dans les 48 heures suivant l'arrivée du patient en réanimation ou en chirurgie orthopédique</p>	<p>Dans les 48h suivant l'arrivée du patient en réanimation ou en chirurgie orthopédique après un délai suffisant de réflexion.</p>

5.4 CALENDRIER DE LA RECHERCHE

- Durée de la période d'inclusion : 12 mois
- Durée de participation de chaque patient (de l'inclusion à la fin de l'étude) : 9 mois
- Durée totale de la recherche (inclusion du premier patient jusqu'aux derniers recueils de données cliniques du dernier patient inclus) : 21 mois

5.5 VISITE DE PRE-INCLUSION

Les patients sont inclus lors de leur arrivée en réanimation ou en chirurgie orthopédique dans les suites d'un traumatisme crânien ou d'une lésion médullaire.

5.6 VISITE D'INCLUSION

Tous les patients consécutifs éligibles seront informés de cette étude et invités à y participer, dans les 48 premières heures suivant l'arrivée du patient dans le service de réanimation ou en chirurgie orthopédique (*Annexe 0*).

Le médecin réanimateur ou de Médecine Physique et de Réadaptation (MPR) ou le chirurgien orthopédiste informe le patient lorsqu'il se trouve dans la capacité de consentir ou la personne de confiance si le patient est dans l'incapacité de consentir (coma) et récupère le formulaire de consentement daté et signé.

5.7 VISITES DE SUIVI DE LA RECHERCHE

- Prélèvements biologiques :
 - Pour le sang périphérique/plasma, urines et LCR à J+2, J+8 et J+15 après le premier prélèvement ou le jour de la sortie du service si < J+15, réalisés par un infirmier du service recruteur,
 - Le LCR seulement si neurochirurgie, ponction lombaire ou dérivation ventriculaire externe.

- Paramètres cliniques recueillis à **J+2 (+/- 2 jours)** de l'inclusion du patient, réalisés par un médecin du service (*cf Annexe 0*):
 - Date de l'accident
 - Données Patients : date de naissance, sexe, poids, taille, consommation de tabac, consommation d'alcool, origine ethnique (Remarque : les sujets à peau noires sont considérés comme étant plus à risque de développer des POA après implantation de prothèse totale de hanche ou fractures acétabulaires ; ce sur-risque n'a jamais été montré pour les POA neurologiques [331][332]).
 - Données SMUR : Score Glasgow initial, perte de connaissance initiale, polytraumatisme (oui/non), mécanisme de l'accident (traumabase), désincarcération (traumabase), écrasé-projeté (traumabase), inhalation pulmonaire lors de l'intubation, arrêt cardiorespiratoire
 - Lésions neurologiques : localisation des lésions cérébrales et/ou médullaire, type de lésions, lésions extra-cérébrales, fracture du crâne, engagements, évacuation hématome,

dérivation ventriculaire externe (traumabase), Abbreviated Injury Scale (AIS) head, score ASIA

- Lésions autres organes : Traumatisme musculaire, Fractures, Luxations, AIS Membres, AIS Colonne Vertébrale, Traumatisme thoracique, AIS Thorax, Traumatisme pelvien, Traumatisme abdominal, AIS Abdomen, Traumatisme facial, AIS Tête
 - AIS total
 - Chirurgie rachidienne de décompression médullaire
- Paramètres cliniques recueillis à **J+8, J+15 et le jour de la sortie du service (+/- 2 jours)**, réalisés par un médecin réanimateur ou orthopédiste (*cf Annexe 0*):
 - Thérapeutiques utilisées : sédatifs pour neuro-protection, sédatifs pour agitation, curares, drogues vasoactives, corticoïdes, circulation extra corporelle, membrane d'oxygénation, exacyl, anti-épileptiques, anti-dépresseurs, dialyse, antibiotiques,
 - Statut neurologique : Coma, dysautonomie, déficits neurologiques initiaux cognitif, Orientation dans le temps et l'espace, déficit moteur (complet/incomplet/pas de déficit), American Spinal Injury Association score (ASIA) (*Annexe 1*), déficit moteur, commande motrice, choc spinal, échelle d'Ashworth modifiée de l'ensemble des groupes musculaires présents autour des articulations potentiellement concernées par les POAN (*Annexe 2*), aggravation neurologique secondaire, hypertension intracrânienne avec pression intracrânienne > 20 mmHg
 - Statut infectieux (*Annexe 3*) : Nombre d'infections pulmonaires, urinaires, cutanées/sur cathéter, méningées, ostéoarticulaires et autres au cours du séjour, sévérité pour chaque infection, nom des bactéries identifiées pour chaque infection
 - Statut respiratoire : date de l'extubation, date de la trachéotomie, date de sevrage de la ventilation mécanique, syndrome de détresse respiratoire aigüe (traumabase)
 - Statut inflammatoire : escarres, événement thromboembolique
 - Kinésithérapie : kinésithérapie respiratoire, mobilisation passive des 4 membres dans l'ensemble des secteurs articulaires, installation au fauteuil, verticalisation sur plan.
 - Paramètres cliniques recueillis **le jour de la sortie (+/- 2 jours)** du service par le médecin du service (*cf Annexe 0*) :
 - Date de départ du service
 - Service d'aval
 - Examen neurologique : orientation dans le temps et espace, Galveston Orientation and Amnesia Test (GOAT) (*Annexe 4*), Glasgow outcome scale – extended (GOS-E), Examen cognitif, Examen moteur, déficit moteur, commande motrice, échelle d'Ashworth modifiée (*Annexe 2*), autres déficiences, agitation, score ASIA

- Alimentation: Gastrostomie, date de retrait de la sonde naso-gastrique, date de la première prise alimentaire
- Examen articulaire: amplitudes passives des hanches, genoux, coudes, épaules.
- Index de Barthel (*Annexe 7*)
- Paramètres cliniques recueillis à **M+1, M+2, M+3, M+6, M+9 (+/- 7 jours)** (*cf Annexe 0*) depuis la visite d'inclusion. Patient hospitalisé en réanimation ou service d'aval (neurochirurgie, orthopédie, rééducation...) ou rentré au domicile. Recueil réalisé par un médecin MPR ou kinésithérapeute :
 - Date de la consultation
 - Lieu du RDV
 - Date du retour au domicile
 - Examen neurologique: orientation dans le temps et espace, Galveston Orientation and Amnesia Test (GOAT) (*Annexe 4*), Glasgow outcome scale – extended (GOS-E), Examen cognitif, Examen moteur, déficit moteur, commande motrice, échelle d'Ashworth modifiée (*Annexe 2*), autres déficiences, agitation, score ASIA
 - Examen articulaire: amplitudes passives des hanches, genoux, coudes, épaules (*Annexe 6*)
 - Thérapeutiques utilisées: sédatifs pour agitation, anti-inflammatoires, anti-épileptiques, anti-dépresseurs, antibiotiques,
 - Statut infectieux (*Annexe 3*): Nombre d'infections pulmonaires, urinaires, cutanées et autres, sévérité pour chaque infection, nom des bactéries identifiées pour chaque infection
 - Statut respiratoire: date de sevrage de la trachéotomie, syndrome de détresse respiratoire aigüe
 - Statut inflammatoire: escarres, événements thromboemboliques
 - Kinésithérapie: mobilisation passive des 4 membres dans l'ensemble des secteurs articulaires, installation au fauteuil, verticalisation sur plan.
 - Index de Barthel (*Annexe 7*)

5.8 VISITE ANNEXE CAR NON SYSTEMATIQUE

Un examen radiologique (échographie ou angioscanner avec reconstruction 3 dimensions) sera effectué uniquement en cas de suspicion clinique de POAN, comme en pratique courante. L'examen sera effectué par un médecin radiologue des hôpitaux participants (échographie en réanimation ou angioscanner avec reconstruction 3 dimensions en radiologie).

5.9 TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES RECUEILLIES

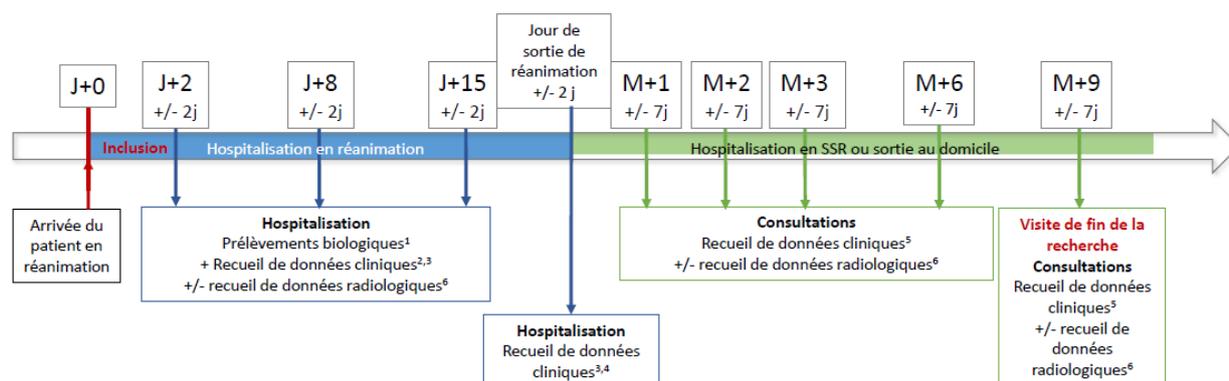
	Visite d'inclusion (J0)*	Visite J2 (J0+2j)	Visite J8 (J0+8j) et Ou Jour sortie de service réa si <J15	Visite J15 (J0+15j±7j)	Visite sortie de réanimation (±7j)	Visites M1, M2, M3, M6, M9 (±7j)
Vérification des critères d'éligibilité	✓*					
Information et recueil du consentement	✓*					
Prélèvements de liquides biologiques	✓*		✓	✓		
Date de l'accident		✓				
Date de départ du service de réanimation/ Service d'aval					✓	
Date de la consultation/ Lieu du RDV/ Date retour						✓**
Données patients		✓				
Données SMUR		✓				
Lésions neurologiques		✓				
Lésions autres organes		✓				
Thérapeutiques utilisés		✓	✓	✓		✓**
AIS Total		✓				
Statut neurologique			✓	✓		
Statut infectieux			✓	✓		✓**
Statut respiratoire			✓	✓		✓**
Statut inflammatoire			✓	✓		✓**
Kinésithérapie			✓	✓		✓**
Index de Barthel					✓	
Alimentation					✓	✓**
Examen neurologique					✓	✓**
Examen articulaire					✓	✓**

Echographie ou angioscanner (en cas de suspicion clinique de		±	±	±	±	±**
Recueil des EIG	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* dans les 48 premières heures suivant l'arrivée du patient dans le service de réanimation

**Ces examens font partie des soins courants pour la visite M6.

5.10 SCHEMA RECAPITULATIF DE LA CHRONOLOGIE DE LA RECHERCHE



Cf calendrier de la recherche :

- 1 Prélèvements biologiques
- 2 Données cliniques à J+ 2 (+/- 2 jours)
- 3 Données cliniques à J+ 8, J+ 15 et le jour de sortie du service de réanimation (+/- 2 jours)
- 4 Données cliniques le jour de la sortie du service de réanimation (+/- 2 jours)
- 5 Données cliniques recueillis à M+1, M+2, M+3, M+6, M+9 (+/- 7 jours) de l'inclusion
- 6 Examens d'imagerie

5.11 DISTINCTION SOIN-RECHERCHE

TABLEAU : Distinction entre les actes liés au « soin » et les actes ajoutés par la « recherche »

Interventions réalisées dans le cadre de la recherche	Actes, procédures et traitements liés aux <u>soins</u>	Actes, procédures ajoutés par <u>la recherche</u>
Consultations	À la sortie de réanimation, patient hospitalisé dans un service d'aval pour une durée variable.	Consultations supplémentaires à 15 jours, 1, 2, 3 et 9 mois.

	Consultations à 0 et 6 mois habituelles	
Prises de sang	Quotidiennes	Tubes supplémentaires
Imagerie	Imagerie diagnostique en présence de signes cliniques évocateurs de POAN	Aucun

5.12 COLLECTION BIOLOGIQUE

Les échantillons de sang (plasma), urine et LCR issus des prélèvements réalisés dans le cadre de la recherche feront l'objet d'une collection biologique.

- Les prélèvements de sang spécifiquement pour les besoins de la recherche seront de 6 ml à chaque prélèvement soit 12 ml au total pour chaque patient (3 prélèvements par patient). Les prélèvements sanguins dans le cadre du soin sont d'environ 10 ml par jour. Les prélèvements réalisés dans le cadre du soin et de la recherche seront donc inférieur ou égal à 16 ml par prélèvement.
- Les prélèvements d'urines spécifiquement pour les besoins de la recherche seront de 50 ml à chaque prélèvement soit 150 ml au total pour chaque patient (3 prélèvements par patient). Les prélèvements d'urines spécifiquement pour les besoins de la recherche et soin ne dépasseront pas 400 ml par période de 30 jours.
- Les prélèvements de selles spécifiquement pour les besoins de la recherche seront de 50 ml à chaque prélèvement soit 150 ml au total pour chaque patient (3 prélèvements par patient). Les prélèvements de selles spécifiquement pour les besoins de la recherche et soin ne dépasseront pas 400 ml par période de 30 jours.
- Les prélèvements du liquide céphalo-rachidien spécifiquement pour les besoins de la recherche seront de 1 ml à chaque prélèvement soit 12 ml au total pour chaque patient (3 prélèvements par patient). Les prélèvements réalisés dans le cadre du soin et de la recherche seront donc inférieur ou égal à 5ml par prélèvement.

Pendant la recherche, les collections seront conservées au laboratoire du Centre de ressources biologiques de Bichat (CRB) (Hôpital Bichat, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris) sous la responsabilité de Mme Huart et Dr Tubiana et au CRB de l'HEGP de Mme Daniela Geromin et Dr Benoit Verdier pendant une durée totale de 2 ans. Les échantillons seront conservés dans un congélateur à -80°C.

A l'issue de la recherche, les échantillons pourront être conservés pour constituer une base de données biologiques dans l'unité de recherche UMR-S/MD1197, IRBA-CTSA, Hôpital Percy, 1 Rue du Lieutenant Raoul Batany, 92190 Clamart, France. Ils seront ensuite utilisés pour des analyses non prévues dans le protocole pouvant se révéler intéressantes dans le cadre de la pathologie et en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques notamment en recherche fondamentale, sous

réserve que le patient de n'y soit pas opposé, après en avoir été informé, comme indiqué dans le formulaire de consentement. Ces analyses feront l'objet d'un nouvel appel à projet ou PHRC.

Dans le cas de conservation de la collection à la fin de la recherche, la collection sera déclarée au ministre chargé de la recherche [et au directeur de l'agence régionale de santé territorialement compétent si l'organisme est un établissement de santé] (article L. 1243-3 du CSP).

Type de prélèvement	Quantité	Lieu de conservation	Responsable de la collection	Finalité de la collection	Durée de la conservation	Devenir (destruction, ...)
Plasma	2 millilitres	Congélateur - 80° de l'unité de recherche UMR-S/MD1197, IRBA-CTSA, Hôpital Percy, 1 Rue du Lieutenant Raoul Batany, 92190 Clamart, France	Pr Banzet	Analyses supplémentaires basées sur l'évolution de la recherche fondamentale	3 ans	Destruction
Urines	5 millilitres					
LCR	2 millilitres					

6. SELECTION

6.1 CRITERES D'INCLUSION

- Homme ou Femme > 18 ans,
- Consentement éclairé signé patient / proche
- Accident datant de moins de 48 heures

Patients avec traumatisme crânien :

- Glasgow initial < 8 ou
- Glasgow initial entre 8 et 14 associé à un « Injury Severity Score » (ISS) > 15 et une chirurgie dans les 24 heures suivant l'admission.

ou

- Patients avec traumatisme médullaire d'origine traumatique entraînant une lésion médullaire qu'elle soit par compression ou par section, avec une atteinte complète de la moelle épinière (para/tétraplégie complète).

6.2 CRITERES DE NON INCLUSION

- Age < 18 ans,
- Choc hémorragique ou transfusion sanguine supérieure ou égale à 4 culots globulaires dans les 6 heures suivant le traumatisme (compter également les culots pré-hospitaliers ou du premier hôpital),
- Suivi impossible sur un an,
- Patient n'habitant pas en région parisienne,
- Femme enceinte ou allaitante,
- Patient sous tutelle ou curatelle.
- Non affiliation à un régime de sécurité sociale ou CMU.

6.3 MODALITES DE RECRUTEMENT

- Cette étude observationnelle cherche à évaluer l'incidence de survenue des POAN sur l'année suivant un accident neurologique cérébral ou médullaire grave. Elle sera donc proposée à tous les patients respectant les critères d'inclusion et d'exclusion.
- Chaque service de réanimation accueille en moyenne 100 patients traumatisés crâniens graves ou modérés dans le cadre d'un polytraumatisme et/ou lésion médullaire complète par an (données extraites de la base de données « traumabase »). Par exemple, les données de la Traumabase ont montré que le service de réanimation de Beaujon a pris en charge 182 patients avec TC graves en 2018. Une étude réalisée par le service d'orthopédie de l'HEGP a retrouvé 20 patients blessés médullaires sur une année dans ce service.
- Nous estimons que la moitié de ces patients au moins rempliront les autres critères d'éligibilité de notre étude et accepteront d'y participer. La période d'inclusion des 118 sujets nécessaires sera donc de 12 mois.
- Le recrutement s'effectue dans les 48 heures suivant l'arrivée du patient dans l'unité de réanimation ou de chirurgie orthopédique de l'hôpital.

	Nombre de sujets
Nombre total de sujets sélectionnés	118

Nombre de centres	4
Période d'inclusion (mois)	12
Nombre des sujets / centre	30
Nombre de sujets / centre / mois	2,5

7. REGLES D'ARRET

Différentes situations existent :

- Arrêt temporaire, l'investigateur doit documenter la raison de l'arrêt et sa reprise dans le dossier source du sujet et le CRF.
- Arrêt prématuré, mais le sujet reste dans la recherche, jusqu'à la fin de sa participation, l'investigateur doit documenter la raison.

7.1 CRITERES ET MODALITES D'ARRET PREMATURE DE LA PARTICIPATION A LA RECHERCHE D'UN SUJET

- Tout sujet peut arrêter sa participation à la recherche, à n'importe quel moment et quelle qu'en soit la raison.
- Sujet perdu de vue : on ne sait pas ce qu'est devenu le sujet. L'investigateur doit mettre tout en œuvre pour reprendre contact avec le sujet (et le documenter dans le dossier source) afin de savoir au moins si le sujet est vivant ou décédé,
- L'investigateur peut interrompre temporairement ou définitivement la participation d'un sujet à la recherche pour toute raison ayant un impact sur sa sécurité ou qui servirait au mieux les intérêts du sujet.
- En, cas d'arrêt prématuré de la participation du sujet à la recherche, les données le concernant pourront être utilisées jusqu'à la date de retrait de consentement
- Il n'y aura aucun impact pour le patient en cas d'arrêt prématuré de la participation à la recherche. Le suivi par un Médecin de Médecin Physique et de Réadaptation s'effectuera en hospitalisation ou en consultation comme effectué traditionnellement.

En cas d'arrêt prématuré de la recherche d'un sujet, ou de retrait du consentement, les données le concernant recueillies avant l'arrêt prématuré pourront être utilisées

- Le cahier d'observation doit lister les différentes raisons d'arrêt de participation à la recherche :
 - Effet indésirable
 - Autre problème médical

- Raison personnelle du sujet
- Retrait explicite de consentement.

- Modalités de remplacement de ces personnes, le cas échéant

Pas de remplacement car seront inclus tous les patients admis en réanimation ou en chirurgie orthopédique respectant les critères d'inclusion et d'exclusion pour l'étude de l'incidence de POAN dans l'année suivant l'accident neurologique.

- Arrêt d'une partie ou de la totalité de la recherche

Le promoteur AP-HP se réserve le droit de suspendre définitivement les inclusions, à tout moment, s'il s'avère que les objectifs d'inclusion ne sont pas atteints.

En cas d'arrêt de la recherche, les sujets en cours de participation dans la recherche seront suivis jusqu'à la fin de leur participation, comme prévu par le protocole.

8. VIGILANCE

« Dans le cadre de cette étude, les événements indésirables (graves ou non) ne sont pas à notifier au promoteur. La notification doit se faire dans le cadre de la vigilance mise en place dans le cadre du soin pour le produit ou la pratique faisant l'objet de la recherche (pharmacovigilance pour un médicament, matériovigilance pour un dispositif médical...).

9. GESTION DES DONNEES

9.1 MODALITES DE RECUEIL DES DONNEES

Chaque patient se verra attribuer un identifiant unique qui servira à indexer le CRF ou l'e-CRF. Les données seront recueillies de deux manières différentes dans l'étude : sur un cahier d'observation papier (aide à la saisie) et via une interface web (e-CRF).

9.2 IDENTIFICATION DES DONNEES RECUEILLIES DIRECTEMENT DANS LES CRF QUI SERONT CONSIDEREES COMME DONNEES-SOURCE

Les auto-questionnaires remplis par les patientes au cours des différentes visites seront considérés comme données sources.

9.3 DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

Selon les bonnes pratiques cliniques et les procédures du promoteur, les personnes ayant un accès direct selon les mesures juridiques et réglementaires en vigueur (à savoir les investigateurs, les

personnes en charge du contrôle de la qualité, l'ARC, cf. article L.1121-3 du Code de la santé publique, et toutes les personnes qui collaborent à des essais) prennent toutes les précautions nécessaires pour assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux essais cliniques, aux personnes qui s'y prêtent, notamment en ce qui concerne leur identité ainsi que les résultats obtenus. Les données recueillies lors des contrôles ou des audits qualité sont ensuite rendues anonymes.

9.4 ACCES AUX DONNEES

Conformément aux bonnes pratiques cliniques :

- le promoteur est chargé d'obtenir l'accord de l'ensemble des parties impliquées dans la recherche afin de garantir l'accès direct à tous les lieux de déroulement de la recherche, aux données source, aux documents source et aux rapports dans un but de contrôle de qualité et d'audit par le promoteur,
- les investigateurs mettront à disposition des personnes chargées du suivi, du contrôle de qualité, en cas d'audit de la recherche impliquant la personne humaine, les documents et données individuelles strictement nécessaires à ce contrôle, conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur

- Documents source

Les documents source étant définis comme tout document ou objet original permettant de prouver l'existence ou l'exactitude d'une donnée ou d'un fait enregistrés au cours de la recherche seront conservés pendant 15 ans par l'investigateur ou par l'hôpital s'il s'agit d'un dossier médical hospitalier.

Dans le cadre de notre étude, les documents sources seront le dossier médical papier ou informatisé, l'original des résultats d'examen biologiques.

- Confidentialité des données

Les personnes chargées du contrôle de qualité d'une recherche impliquant la personne humaine (article L.1121-3 du code de la santé publique), prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives à la recherche, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus.

Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel (selon les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal).

Pendant la recherche impliquant la personne humaine ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au promoteur par les investigateurs (ou tous autres intervenants spécialisés) seront rendues non identifiantes.

Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse.

Seules les initiales du nom et du prénom seront enregistrées, accompagnées d'un numéro codé propre à la recherche indiquant l'ordre d'inclusion des sujets.

Le promoteur s'assurera que chaque personne qui se prête à la recherche a donné son accord par écrit pour l'accès aux données individuelles la concernant et strictement nécessaires au contrôle de qualité de la recherche.

9.5 TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES

- Identification du responsable et du lieu de la gestion du traitement des données

La saisie des données cliniques sera réalisée par un médecin de réanimation dès J+0, tout au long du séjour de réanimation jusqu'à la sortie du service de réanimation. Le recueil de données à partir de J+15, M+1, M+2, M+3, M+6, M+9 +/- 7 jours seront collectés par un médecin de MPR, un kinésithérapeute ou un TEC. Les données seront inscrites dans un e-CRF ou via un CRF papier puis reporté sur l'e-CRF.

Les analyses statistiques seront mises en œuvre par l'unité de biométrie de l'URC HUPIFO sous la responsabilité du Pr Lamiae GRIMALDI. Un plan d'analyse statistique sera développé et validé avant le début des analyses.

- Saisie des données

e-CRF : La saisie des données rendues non identifiantes sera réalisée sur un support papier et électronique via un navigateur internet.

- Traitements des données (CNIL)

Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de Référence pour les traitements de données personnelles opérés dans le cadre des recherches biomédicales » (MR-001 modifiée). L'AP-HP, promoteur de la recherche, a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de Référence »

- Archivage

Les documents spécifiques d'une recherche impliquant la personne humaine à risque et contraintes minimales seront archivés par l'investigateur et le promoteur pour une durée de 15 ans après la fin de la recherche.

Cet archivage indexé comporte notamment :

- Une enveloppe scellée pour **l'investigateur** contenant un exemplaire original de toutes les notes d'information et les formulaires de consentement signés de toutes les personnes du centre ayant participé à la recherche ;
- Une enveloppe scellée pour le **promoteur** contenant un exemplaire de toutes les notes d'information et les formulaires de consentement signés de toutes les personnes du centre ayant participé à la recherche ;

- Les classeurs « recherche » pour **l'Investigateur et le promoteur** comprenant (liste non exhaustive) :
 - les versions successives du protocole (identifiées par le n° et la date de version), ses annexes
 - les avis du CPP
 - les courriers de correspondance,
 - la liste ou registre d'inclusion,
 - les annexes spécifiques à la recherche
 - le rapport final de la recherche.
- Les documents de recueil des données.

9.5 PROPRIETE DES DONNEES

L'AP-HP est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

10. ASPECTS STATISTIQUES

10.1 DESCRIPTION DE LA POPULATION

Un diagramme de flux des patients mettra en évidence le nombre de patients éligibles, le nombre de patients effectivement inclus ainsi que le nombre de patients perdus de vue à chaque visite.

La description des données se fera pour l'ensemble des patients. Les variables qualitatives seront décrites par leur effectif et pourcentage par modalité de réponse, et les variables quantitatives par leur effectif, moyenne, écart-type, minimum, maximum, ainsi que leur médiane et intervalle interquartile (25ème percentile - 75ème percentile). Le nombre de données manquantes pour chaque variable sera également précisé.

Les analyses statistiques seront mises en œuvre par l'unité de biométrie de l'URC HUPIFO sous la responsabilité du Pr Lamiae GRIMALDI. Un plan d'analyse statistique sera développé et validé avant le début des analyses.

10.2 ANALYSE PRINCIPALE

Pour l'objectif principal, l'incidence de POAN dans l'année après l'inclusion, avec son IC 95% sera calculée parmi les patients inclus dans l'étude.

10.3 ANALYSES SECONDAIRES

L'incidence de POAN dans l'année après l'inclusion, avec son IC 95% sera calculée aussi séparément dans les deux groupes : traumatisme crânien et lésion médullaire à l'inclusion.

Des régressions logistiques univariées seront réalisées pour expliquer la survenue de POAN par les paramètres cliniques et biologiques d'intérêt à l'inclusion.

Un score de risque de survenue de POAN sera construit sur la base du modèle multivarié. Les variables considérées pour la construction de ce score seront celles avec des p-values ≤ 0.2 dans les modèles de régressions logistiques univariées ci-dessus (expliquant la survenue de POAN à 9 mois). La sélection des variables pour le modèle final (score prédictif de POAN) sera réalisée avec la méthode pas-à-pas descendant.

Pour chacun des paramètres avec mesures répétées, des modèles de régression logistique multiniveau seront réalisés pour expliquer la survenue de POAN par l'évolution du paramètre respectif.

Pour chaque paramètre biologique avec une association statistiquement significative avec la survenue de POAN, ainsi que pour le score, la méthode de Youden sera utilisée pour calculer des seuils ; les performances pronostiques de survenue de POAN (sensibilité, spécificité, AUC, valeur prédictive positive et négative) seront également calculées.

Les analyses seront effectuées à l'aide du logiciel R version 3.4 ou ultérieure (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>), ou SAS version 9.4 ou ultérieure (SAS Institute, Cary, NC). Le seuil α sera fixé à 0,05.

10.4 JUSTIFICATION DU NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRES

Des données de la littérature ont montré la survenue de POAN chez 20 à 29% des patients avec lésion médullaire (11)(12)(13) et 5 à 20% des traumatisés crâniens (11) (15) (13)(7). Un effectif de 118 patients (dont 15% de perdus de vue) permettra d'estimer l'incidence de POAN attendue (15%) avec une précision de 7%, soit un IC 95% de 8-22 (alpha 5%).

11. CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE

11.1 ORGANISATION GENERALE

Le promoteur doit s'assurer de la sécurité et du respect des personnes qui ont accepté de participer à la recherche. Il doit mettre en place un système d'assurance qualité permettant de surveiller au mieux le déroulement de la recherche dans les centres investigateurs.

A cet effet le promoteur définira une stratégie d'ouverture des centres et pourra le cas échéant mettre un place un contrôle qualité des données.

- Stratégie d'ouverture des centres

La stratégie d'ouverture des centres sera déterminée avant le démarrage de la recherche.

- Contrôle qualité des données

Un Attaché de Recherche Clinique (ARC) mandaté par le promoteur s'assurera de la bonne réalisation de la recherche, du recueil des données générées par écrit, de leur documentation, enregistrement et rapport, en accord avec les Procédures Opératoires Standard mises en application au sein du DRCD.

L'investigateur et les membres de son équipe acceptent de se rendre disponibles lors des visites de Contrôle de qualité effectuées à intervalles réguliers par l'Attaché de Recherche Clinique.

11.2 CAHIER D'OBSERVATION

- CRF papier et e-CRF :

Cette étude se déroulant dans le service de réanimation, il sera difficile d'avoir un ordinateur à chaque fois à disposition, par conséquent le recueil des données se fera en deux temps.

Sur un CRF papier, toutes les informations requises par le protocole doivent être consignées sur les cahiers d'observation et une explication doit être apportée pour chaque donnée manquante. Les données devront être recueillies au fur et à mesure qu'elles sont obtenues, et transcrites dans ces cahiers de façon nette et lisible.

Les données erronées relevées sur les cahiers d'observation seront barrées et les nouvelles données seront copiées, à côté de l'information barrée, accompagnées des initiales, de la date et éventuellement d'une justification par l'investigateur ou la personne autorisée qui aura fait la correction.

Et après, les données seront colligées dans une base de données sous format d'un e-CRF.

Ce cahier d'observation électronique sera mis en place dans chacun des centres grâce à un support Internet de recueil des données. Un document d'aide pour l'utilisation de cet outil sera fourni aux investigateurs. Le remplissage du cahier d'observation via internet par l'investigateur permet ainsi à l'ARC de visualiser rapidement et à distance les données. L'investigateur est responsable de l'exactitude, de la qualité et de la pertinence de toutes les données saisies. De plus, lors de leurs saisies, ces données sont immédiatement vérifiées grâce à des contrôles de cohérence. L'investigateur doit valider toute modification de valeur dans le CRF. Ces modifications font l'objet d'un audit trail. Une justification peut éventuellement être intégrée en commentaire.

Une impression papier sera demandée en fin d'étude, authentifiée (datée et signée) par l'investigateur. L'original de ce document sera archivé par le promoteur. Une copie du document authentifié devra être archivée par l'investigateur.

11.3 GESTION DES NON CONFORMITES

Tout évènement survenant suite au non-respect du protocole, des procédures opératoires standardisées, ou des dispositions législatives et réglementaires en vigueur par un investigateur ou

toute autre personne impliquée dans la conduite de la recherche doit faire l'objet d'une déclaration de non-conformité au promoteur.

Ces non-conformités seront gérées conformément aux procédures du promoteur.

11.4 AUDIT

Les investigateurs s'engagent à accepter les audits d'assurance qualité effectués par le promoteur ainsi que les inspections effectuées par les autorités compétentes. Toutes les données, tous les documents et rapports peuvent faire l'objet d'audits et réglementaires sans que puisse être opposé le secret médical.

Un audit peut être réalisé à tout moment par des personnes mandatées par le promoteur et indépendantes des responsables de la recherche. Il a pour objectif de s'assurer de la qualité de la recherche, de la validité de ses résultats et du respect de la loi et des réglementations en vigueur.

Les personnes qui dirigent et surveillent la recherche acceptent de se conformer aux exigences du promoteur en ce qui concerne un audit

L'audit pourra s'appliquer à tous les stades de la recherche, du développement du protocole à la publication des résultats et au classement des données utilisées ou produites dans le cadre de la recherche.

11.5 ENGAGEMENT DE RESPONSABILITES DE L'INVESTIGATEUR PRINCIPAL

Avant de démarrer la recherche, chaque investigateur fournira au représentant du promoteur de la recherche son curriculum vitæ personnel actualisé, daté de moins d'un an et signé, comportant son numéro RPPS. Le CV devra comprendre les participations antérieures à des recherches et les formations liées à la recherche clinique.

Chaque investigateur s'engagera à respecter les obligations législatives et réglementaires et à mener la recherche conformément à la réglementation, en respectant les termes de la déclaration d'Helsinki en vigueur.

L'investigateur principal de chaque centre participant signera un engagement de responsabilités (document type DRCD) qui sera remis au représentant du promoteur.

Les investigateurs et leurs collaborateurs signeront un formulaire de délégation de fonctions précisant le rôle de chacun et fourniront leur CV.

12. ASPECTS ETHIQUES ET LEGAUX

12.1 MODALITES D'INFORMATION ET DE RECUEIL DU CONSENTEMENT DES PERSONNES SE PRETANT A LA RECHERCHE

- Les personnes informées du protocole de recherche sont le/la participant(e) et en l'impossibilité du participant à consentir (coma), l'information sera donnée à la personne de confiance.
- Les personnes habilitées à consentir sont le/la participant(e) ou la personne de confiance du participant, si ce dernier est dans l'incapacité de donner son consentement (coma).
- L'information et de recueil du consentement s'effectuera dans les 24 heures suivant l'arrivée du patient en réanimation
- Une note d'information sera remise au participant ou à sa personne de confiance ainsi qu'une information orale détaillée.
- L'information orale, la note d'information et le consentement sont données et recueillis par le médecin réanimateur, orthopédiste ou un médecin MPR.

12.2 OBLIGATIONS LEGALES

L'Assistance publique hôpitaux de Paris (AP-HP) est le promoteur de cette recherche et par délégation le Département de la recherche Clinique et du Développement (DRCD) en assure les missions, conformément à l'article L.1121-1 du code de la santé publique. L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons médicales ou administratives ; dans cette éventualité, une notification sera fournie à l'investigateur.

12.3 DEMANDE D'AVIS AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES CPP

L'AP-HP en tant que promoteur obtient pour la recherche à risque et contraintes minimales, préalablement à sa mise en œuvre l'avis favorable du CPP concerné, dans le cadre de ses compétences et conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

12.4 INFORMATION DE L'ANSM

Le promoteur AP-HP transmettra, pour information à l'ANSM, l'avis favorable du CPP et le résumé du protocole.

12.5 ENGAGEMENT DE CONFORMITE A LA « METHODOLOGIE DE REFERENCE » MR 001

L'AP-HP, promoteur de la recherche, a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de Référence ».

12.6 MODIFICATIONS DE LA RECHERCHE

Toute modification substantielle apportée au protocole, devra être transmise au promoteur pour approbation. Après cet accord, le promoteur devra obtenir préalablement à sa mise en œuvre un avis favorable du CPP.

La note d'information et le formulaire de consentement pourront être révisés si nécessaire, notamment en cas de modification substantielle de la recherche ou de la survenue d'effets indésirables.

13. FINANCEMENT ET ASSURANCE

13.1 SOURCE DE FINANCEMENT

National Health and Medical Research Council, Australia government

United States Department of Defense (demande de financement envoyée le 6 septembre 2019).

13.2 ASSURANCE

Le Promoteur, souscrit pour toute la durée de la recherche une assurance garantissant sa propre responsabilité civile ainsi que celle de tout médecin impliqué dans la réalisation de la recherche. Il assure également l'indemnisation intégrale des conséquences dommageables à la recherche pour la personne qui s'y prête et ses ayants droit, sauf preuve à sa charge que le dommage n'est pas imputable à sa faute ou à celle de tout intervenant, sans que puisse être opposé le fait d'un tiers ou le retrait volontaire de la personne qui avait initialement consenti à se prêter à la recherche.

L'Assistance Publique- Hôpitaux de Paris (AP-HP) a pris une assurance auprès de la compagnie HDI-GERLING par l'intermédiaire de BIOMEDIC-INSURE, garantissant sa responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant (médecin ou personnel impliqué dans la réalisation de la recherche), conformément à l'article L.1121-10 du CSP.

14. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

L'APHP devra obligatoirement être mentionnée dans les affiliations du ou des auteurs des publications qui résulteront de cette recherche et mentionner le promoteur AP-HP (DRCD) et la source de financement si votre projet résulte d'un appel d'offres (par exemple le PHRC national ou régional), et

nous en adresser un exemplaire (cf. ci-dessous les modalités d'affiliation et de mention du promoteur et du financeur).

14.1 MENTION DE L’AFFILIATION DE L’AP-HP POUR LES PROJETS PROMUS PAR L’AP-HP

- *La recherche est financée dans le cadre d’un appel d’offre interne de l’AP-HP, la première affiliation devrait être « AP-HP »*
- *Chacune de ces affiliations doit être identifiée par une adresse séparée par un point-virgule (;*
- *L’institution AP-HP doit apparaître sous le sigle « **AP-HP** » en premier dans l’adresse suivi précisément par : **AP-HP, hôpital, service, ville, code postal, France***

14.2 MENTION DU PROMOTEUR AP-HP (DRCD) DANS LES ”ACKNOWLEDGMENTS” DU MANUSCRIT

”The sponsor was Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (Département de la Recherche Clinique et du Développement)”

14.3 MENTION DU FINANCEUR DANS LES ”ACKNOWLEDGMENTS” DU MANUSCRIT

”The study was funded by a grant from Assistance Publique – Hôpitaux de Paris”

Cette recherche sera enregistrée sur le site <http://clinicaltrials.gov/> (ajouter le n° numéro d’enregistrement quand la recherche est enregistrée).

15. BIBLIOGRAPHIE

Voir bibliographie du manuscrit de thèse.

16. LISTE DES ADDENDA

Chaque addendum et le registre des versions des addenda sont joints, indépendamment du protocole. Chaque addendum peut être modifié (changement de version de l'addendum) sans modification de la version du protocole.

17. LISTE DES INVESTIGATEURS

Investigateur coordonnateur :

Dr Marjorie SALGA, MD
Service de Médecine Physique et de
Réadaptation
Hôpital Raymond Poincaré
Tél : 01.47.10.70.82
Courriel : marjorie.salga@aphp.fr

Co-Investigateurs :

Dr Julie PAQUEREAU, MD
Service de Médecine Physique et de
Réadaptation
Hôpital Raymond Poincaré
Courriel : julie.paquereau@aphp.fr

Pr Catherine PAUGAM-BURTZ, MD, PhD
Service Réanimation chirurgicale polyvalente,
CHU Beaujon
Courriel : catherine.paugam@aphp.fr

Dr Paer ABBACK, MD
Service Réanimation chirurgicale polyvalente,
CHU Beaujon
Courriel: paer-selim.abback@aphp.fr

Pr Marc Antoine ROUSSEAU, MD,
Service de Chirurgie orthopédique
CHU Beaujon
Courriel : marc-antoine.rousseau@aphp.fr

Pr Romain PIRRACCHIO, MD,
Service Réanimation,
Hôpital Européen Georges Pompidou
Courriel : romain.pirracchio@aphp.fr

Pr Pierre GUIGUI, MD
Service de Chirurgie orthopédique,
Hôpital Européen Georges Pompidou
Courriel : pierre.guigui@aphp.fr

18. QUESTIONNAIRE OU ECHELLE UTILISES

1. Données recueillies au cours des visites
2. Score American Spinal Injury Association (ASIA)
3. Echelle d'Ashworth modifiée, *Source : collège des enseignants de Médecine Physique et de Réadaptation*
4. Infections pendant le séjour en réanimation
5. Test de Galveston Orientation and Amnesia Test (GOAT)
6. Glasgow outcome scale and extended Glasgow outcome scale (interview), *Source : collège des enseignants de Médecine Physique et de Réadaptation*
7. Examen des amplitudes passives
8. Index de Barthel

Visite d'inclusion

Ce fait dans les 48 premières heures suivant l'arrivée du patient

Critères d'inclusion

Homme ou Femme > 18 ans

et

Traumatisme crânien avec score de Glasgow initial < 8

ou

Traumatisme crânien avec score de Glasgow initial entre 8 et 14 associé à un « Injury Severity Score » (ISS) > 15 et une chirurgie dans les 24 heures suivant l'admission

ou

Traumatisme médullaire d'origine traumatique avec atteinte neurologique complète (para/tétraplégie initiale).

Critères de non inclusion

(si la personne présente un de ces critères, elle ne sera pas inclus dans l'étude)

Age < 18 ans

Choc hémorragique ou transfusion sanguine \geq 4 culots globulaires dans les 6 heures suivant le traumatisme (compter également les culots pré-hospitaliers ou du premier hôpital)

Suivi impossible sur un an

Patient n'habitant pas en région parisienne

Femme enceinte ou allaitante

Patient sous tutelle ou curatelle

Non affiliation à un régime de sécurité sociale ou CMU

Signature du consentement le __/__/__

Visite à J+2 de l'inclusion du patient (+/- 2 jours)

Date __/__/__

Entourer les mentions correctes

- Date de l'accident __/__/__

- Données patients
 - Date de naissance __/__/__
 - Sexe : féminin, masculin
 - Poids __ Kg, Taille ___ mètres
 - Consommation de tabac : oui, non, nombre de paquets année : __
 - Consommation d'alcool : __ g d'alcool/jour
 - Origine ethnique : caucasien, africain du nord, africain d'Afrique noire, asiatique, américains du nord, américain du sud

- Données SMUR
 - Score Glasgow lors de la prise en charge SMUR : __
 - Perte de connaissance initiale : oui, non
 - Polytraumatisme : oui, non
 - Mécanisme de l'accident (traumabase)
 - 1 : AVP voiture/camion/bus
 - 2 : AVP 2 roues motorisées
 - 3 : AVP bicyclette
 - 4 : AVP piéton
 - 5 : AVP autre (avion bateau train)
 - 6 : chute d'une hauteur
 - 7 : chute de sa hauteur
 - 8 : arme à feu
 - 9 : arme blanche
 - 10 : traumatisme par objet contendant non pénétrant
 - 11 : autre
 - 12 : inconnu
 - Désincarcération (traumabase) : oui, non
 - Ecrasé, projeté (traumabase) : oui, non

- Inhalation pulmonaire lors de l'intubation : oui, non
- Arrêt cardio-respiratoire : oui, non, no flow __ minutes, low flow : __, minutes

○ Lésions neurologiques :

- Localisation des lésions cérébrales : lobe frontal droit-gauche, lobe temporal droit-gauche, lobe pariétal droit-gauche, lobe occipital droit-gauche, cervelet droit-gauche-médian
- Type de lésions : hématome, pétéchies, lésions axonales diffuses, œdème
- Lésions extra-cérébrales : hématome extradural, sous dural, hémorragie méningée, hémorragie intraventriculaire
- Fracture du crâne : oui, non
- Engagements : Non, sous falcorien, central, temporal, occipital
- Evacuation hématome : Non, trépanation, Craniectomie-repose (sur le même temps opératoire), craniectomie-dépose
- Dérivation ventriculaire externe (traumabase): oui, non
- Abbreviated Injury Scale (AIS) head,
- Score ASIA

○ Lésions autres organes :

- Traumatisme musculaire :
 - Non, plaie, hématome
 - Hanche, genou, épaule, coude, autre
 - Droit-gauche
 - Chirurgie, parage, évacuation, autre
- Fractures :
 - Non, ouverte, fermée, les deux
 - Hanche, genou, épaule, coude, autre
 - Droit-gauche
 - Chirurgie : oui, non
 - Nombre total de chirurgie : 1, 2, 3, 4, ≥5
- Luxations :
 - Oui, non
 - Hanche, genou, épaule, coude, autre
 - Droit-gauche
 - Chirurgie : oui, non
 - Nombre total de chirurgie : 1, 2, 3, 4, ≥5
- AIS Membres
- AIS Colonne Vertébrale
- Traumatisme thoracique
 - Oui, non
 - AIS Thorax

- Chirurgie, drain
- Nombre total de chirurgie/pose de drain : 1, 2, 3, 4, ≥5
- Traumatisme pelvien
 - Oui, non
 - Chirurgie, drain
 - Nombre total de chirurgie/pose de drain : 1, 2, 3, 4, ≥5
- Traumatisme abdominal
 - Oui, non
 - AIS Abdomen
 - Chirurgie, drain
 - Nombre total de chirurgie/pose de drain : 1, 2, 3, 4, ≥5
- Traumatisme facial
 - Oui, non
 - AIS Tête
 - Chirurgie : oui, non
 - Nombre total de chirurgie : 1, 2, 3, 4, ≥5
- AIS total
- Chirurgie rachidienne de décompression médullaire

Visite à J+8 de l'inclusion du patient

A compléter aux autres visites J+15 et visite de sortie de réanimation (+/- 2 jours)

Date J+8 __/__/__

Date J+15 __/__/__

Date de sortie de réanimation __/__/__

Entourer les mentions correctes

- Thérapeutiques utilisés :
 - Sédatifs pour neuro-protection :
 - Non, monothérapie, bithérapie, trithérapie, quadrithérapie, ≥ 4
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Sédatifs pour agitation
 - Non, benzodiazépines, neuroleptiques, anti-histaminiques, autre
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Curares :
 - Non, pour intubation, pour chirurgie, pour SDRA, autre
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Drogues vasoactives :
 - Non, Adrénaline, Noradrénaline, les deux
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Corticoïdes :
 - Non, HSHC, solumedrol, fludrocortisone
 - Nombre de jours d'administration : 1, 2, 3, 4, 5, ≥ 5
 - Dose totale administrée : ___ mg
 - Circulation Extra Corporelle :
 - Non, oui
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Membrane d'oxygénation
 - Non, oui
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Exacyl : Non, oui
 - Anti-épileptiques

- Non, lévétiracétam, acide valproïque, lamotrigine, carbamazépine, gabapentine, prégabaline, topiramate, lacosamide, tiagabine, autre
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Anti-dépresseurs
 - Non, inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, imipraminiques, IMAO, miansérine, mirtazapine
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Dialyse
 - Oui, non
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Antibiotiques.
- Statut neurologique :
- Coma :
 - Oui, non
 - Date de sortie de coma : __/__/__
 - Dysautonomie
 - Oui, non
 - Traitement par bétabloquant : oui, non
 - Orientation dans le temps et l'espace : oui, non
 - American Spinal Injury Association score (ASIA) (*Annexe 1*): __
 - Déficit moteur : pas de déficit, complet, incomplet
 - Commande motrice : globale, analytique, normale
 - Choc spinal : oui, non
 - Echelle d'Ashworth modifiée (*Annexe 2*)
 - Aggravation neurologique secondaire : oui, non
 - Hypertension intracrânienne avec pression intracrânienne > 20 mmHg : oui, non
- Statut infectieux (*Annexe 3*) :
- Nombre d'infections pulmonaires au cours du séjour : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
 - Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique ou pneumopathie d'inhalation pour chaque infection
 - Nombre d'infections urinaires au cours du séjour : __
 - Date de retrait de la sonde urinaire : __/__/__

- Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique
- Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
- Nombre d'infections cutanées et sur cathéter au cours du séjour : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
- Nombre d'infections méningées au cours du séjour : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
- Nombre d'infections ostéoarticulaires au cours du séjour : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
- Nombre d'infections autres au cours du séjour : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection

- Statut respiratoire :
 - Date de l'extubation __/__/__
 - Date de la trachéotomie __/__/__
 - Date d'arrêt de la ventilation mécanique __/__/__
 - Syndrome de détresse respiratoire aigüe (traumabase)
 - Oui, non,
 - Cause : traumatique, infectieuse, autre
 - Sévérité : mineure, modéré, majeure
 - Séances de décubitus ventral : oui, non

- Statut inflammatoire :
 - Escarres : oui, non
 - Localisation : talon D – G, ischions D – G, scapulas D – G, sacrum, occiput
 - Stade pour chaque escarre : 1, 2, 3, 4
 - Événement thromboembolique :
 - Thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire, les deux
 - Nombre d'évènements
 - Traitement : anticoagulation curative, filtre cave

- Kinésithérapie :
 - Kinésithérapie respiratoire : oui, non
 - ❖ Date de la première kinésithérapie respiratoire __/__/__

- ❖ Fréquence par semaine : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
- ❖ Fréquence par jour : 1, 2, ≥3
- Mobilisation passive des 4 membres dans l'ensemble des secteurs articulaires : oui, non
 - ❖ Si non, pourquoi ?
 - ❖ Date de la première mobilisation par kinésithérapie __/__/__
 - ❖ Fréquence par semaine : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 - ❖ Fréquence par jour : 1, 2, ≥3
 - ❖ Durée la séance : 0-15 min, 15-30 min, 30-45 min, ≥ 45 min
 - ❖ Articulations mobilisées au cours d'une séance : épaules D - G, coudes D - G, poignets D - G, hanches D - G, genoux D - G, chevilles D - G
 - ❖ Mobilisation dans toute l'amplitude articulaire : oui, non, si non, pourquoi ?
- Installation au fauteuil
 - ❖ Oui, non, si non, pourquoi ?)
 - ❖ Date de la première installation __/__/__
 - ❖ Fréquence par semaine : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 - ❖ Fréquence par jour : 1, 2, ≥3
 - ❖ Nombre de minutes par jour : 0-15 min, 15-30 min, 30-45 min, ≥ 45 min
- Verticalisation sur plan
 - ❖ Oui/non, si non, pourquoi ?
 - ❖ Date de la première installation __/__/__
 - ❖ Fréquence par semaine : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 - ❖ Fréquence par jour : 1, 2, ≥3
 - ❖ Nombre de minutes par jour : 0-15 min, 15-30 min, 30-45 min, ≥ 45 min

Visite le jour de sortie du service de réanimation (+/- 2 jours)

Date de départ du service de réanimation __/__/__

- Service d'aval
 - Neurochirurgie
 - Orthopédie
 - Chirurgie Maxilo-Faciale
 - Soins de de rééducation post réanimation (SRPR)
 - SSR neurologique
 - SSR polyvalent
 - Autre : ...
- Examen neurologique :
 - Orientation dans le temps et l'espace
 - Galveston Orientation and Amnesia Test (GOAT) (*Annexe 4*)
 - GOS-E (*Annexe 5*)
 - Examen cognitif (possibilité de cocher plusieurs cases)
 - Troubles mnésiques
 - Troubles phasiques
 - Troubles dysexécutifs
 - Troubles praxiques
 - Troubles gnosiques
 - État de conscience minimale
 - Examen moteur (possibilité de cocher plusieurs cases)
 - Monoplégie
 - membre supérieur : droit, gauche
 - membre inférieur : droit, gauche
 - Hémiplégie : droit, gauche
 - Paraplégie
 - Tétraplégie
 - Déficit moteur : pas de déficit, complet, incomplet
 - Commande motrice : globale, analytique, normale
 - Choc spinal : oui, non
 - Echelle d'Ashworth modifiée (*Annexe 2*)
 - Autres déficiences :
 - Syndrome Parkinsonien
 - Cérébelleux

- Vestibulaire
 - Atteinte des paires crâniennes
 - Troubles de la déglutition
 - Vessie neurologique
 - Colon neurologique
 - Agitation : oui, non
 - Score ASIA
- Statut alimentaire :
 - Gastrostomie : oui, non
 - Date de retrait de la sonde naso-gastrique __/__/__
 - Date de la première prise alimentaire __/__/__
 - Examen articulaire : amplitudes passives des hanches, genoux, coudes, épaules (*Annexe 6*)
 - Index de Barthel (*Annexe 7*)

Visite M+1, M+2, M+3, M+6, M+9 /- 7 jours

Date de la consultation __/__/__

- Lieu du RDV
 - Neurochirurgie
 - Orthopédie
 - Chirurgie Maxilo-Faciale
 - Soins de rééducation post réanimation (SRPR)
 - SSR neurologique
 - SSR polyvalent
 - Domicile
 - Autre : ...
- Date du retour au domicile __/__/__
- Examen neurologique :
 - Orientation dans le temps et l'espace
 - Galveston Orientation and Amnesia Test (GOAT) (*Annexe 4*)
 - GOS-E (*Annexe 5*)
 - Examen cognitif (possibilité de cocher plusieurs cases)

- Troubles mnésiques
 - Troubles phasiques
 - Troubles dysexécutifs
 - Troubles praxiques
 - Troubles gnosiques
 - État de conscience minimale
 - Examen moteur (possibilité de cocher plusieurs cases)
 - Monoplégie
 - membre supérieur : droit, gauche
 - membre inférieur : droit, gauche
 - Hémiplégie : droit, gauche
 - Paraplégie
 - Tétraplégie
 - Déficit moteur : pas de déficit, complet, incomplet
 - Commande motrice : globale, analytique, normale
 - Choc spinal : oui, non
 - Echelle d'Ashworth modifiée (*Annexe 2*)
 - Autres déficiences :
 - Syndrome Parkinsonien
 - Cérébelleux
 - Vestibulaire
 - Atteinte des paires crâniennes
 - Troubles de la déglutition
 - Vessie neurologique
 - Colon neurologique
 - Agitation : oui, non
- Examen articulaire : amplitudes passives des hanches, genoux, coudes, épaules (*Annexe 6*)
- Thérapeutiques utilisés :
- Sédatifs pour agitation
 - Non, benzodiazépines, neuroleptiques, anti-histaminiques, autre
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Anti-inflammatoires :
 - Non stéroïdiens, corticoïdes
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Anti-épileptiques

- Non, lévétiracétam, acide valproïque, lamotrigine, carbamazépine, gabapentine, prégabaline, topiramate, lacosamide, tiagabine, autre
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Anti-dépresseurs
 - Non, inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, imipraminiques, IMAO, miansérine, mirtazapine
 - Durée : 1-3 jours, 4-7 jours, 8-14 jours, ≥ 15 jours
 - Antibiotiques
- Statut infectieux (*Annexe 3*):
- Nombre d'infections pulmonaires depuis la dernière consultation : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique, transfert dans un autre service, hospitalisation
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
 - Pneumopathie communautaire, pneumopathie d'inhalation
 - Nombre d'infections urinaires depuis la dernière consultation : __
 - Date de retrait de la sonde urinaire : __/__/__
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique, transfert dans un autre service, hospitalisation
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
 - Nombre d'infections cutanées depuis la dernière consultation : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique, transfert dans un autre service, hospitalisation
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
 - Nombre d'infections autres au cours depuis la dernière consultation : __
 - Sévérité pour chaque infection : sepsis, choc septique, transfert dans un autre service, hospitalisation
 - Nom des bactéries identifiées pour chaque infection
- Statut respiratoire :
- Date de sevrage de la trachéotomie : __/__/__
 - Syndrome de détresse respiratoire aigüe depuis la dernière consultation : oui, non
- Statut inflammatoire :
- Escarres : oui, non
 - Localisation : talon D – G, ischions D – G, scapulas D – G, sacrum, occiput
 - Stade pour chaque escarre : 1, 2, 3, 4

- Événement thromboembolique :
 - Thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire, les deux
 - Nombre d'évènements
 - Traitement : anticoagulation curative, filtre cave

- Kinésithérapie :
 - Mobilisation passive des 4 membres dans l'ensemble des secteurs articulaires : oui, non
 - ❖ Si non, pourquoi ?
 - ❖ Fréquence par semaine : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 - ❖ Fréquence par jour : 1, 2, ≥3
 - ❖ Durée la séance : 0-15 min, 15-30 min, 30-45 min, ≥ 45 min
 - ❖ Articulations mobilisées au cours d'une séance : épaules D - G, coudes D - G, poignets D - G, hanches D - G, genoux D - G, chevilles D - G
 - ❖ Mobilisation dans toute l'amplitude articulaire : oui, non, si non, pourquoi ?

 - Installation au fauteuil
 - ❖ Oui, non, si non, pourquoi ?)
 - ❖ Date de la première installation __/__/__
 - ❖ Fréquence par semaine : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 - ❖ Fréquence par jour : 1, 2, ≥3
 - ❖ Nombre de minutes par jour : 0-15 min, 15-30 min, 30-45 min, ≥ 45 min

 - Verticalisation sur plan
 - ❖ Oui/non, si non, pourquoi ?
 - ❖ Date de la première installation __/__/__
 - ❖ Fréquence par semaine : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 - ❖ Fréquence par jour : 1, 2, ≥3
 - ❖ Nombre de minutes par jour : 0-15 min, 15-30 min, 30-45 min, ≥ 45 min

 - Index de Barthel (*Annexe 7*)

18.2 SCORE AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION (ASIA)

Évaluation motrice		Score ASIA	Identité du patient																																																																																																																																																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 5%; text-align: center;">D</td> <td style="width: 5%; text-align: center;">G</td> <td style="width: 85%;"></td> </tr> <tr><td>C2</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C3</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C4</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C5</td><td></td><td></td><td>Flexion du coude</td></tr> <tr><td>C6</td><td></td><td></td><td>Extension du poignet</td></tr> <tr><td>C7</td><td></td><td></td><td>Extension du coude</td></tr> <tr><td>C8</td><td></td><td></td><td>Flexion du médus (P3)</td></tr> <tr><td>T1</td><td></td><td></td><td>Abduction du 5^e doigt</td></tr> <tr><td>T2</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T3</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T4</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T5</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T6</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T7</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T8</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T9</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T10</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T11</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T12</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>L1</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>L2</td><td></td><td></td><td>Flexion de la hanche</td></tr> <tr><td>L3</td><td></td><td></td><td>Extension du genou</td></tr> <tr><td>L4</td><td></td><td></td><td>Dorsiflexion de cheville</td></tr> <tr><td>L5</td><td></td><td></td><td>Extension du gros orteil</td></tr> <tr><td>S1</td><td></td><td></td><td>Flexion plantaire de cheville</td></tr> <tr><td>S2</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S3</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S4-5</td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>		D	G		C2				C3				C4				C5			Flexion du coude	C6			Extension du poignet	C7			Extension du coude	C8			Flexion du médus (P3)	T1			Abduction du 5 ^e doigt	T2				T3				T4				T5				T6				T7				T8				T9				T10				T11				T12				L1				L2			Flexion de la hanche	L3			Extension du genou	L4			Dorsiflexion de cheville	L5			Extension du gros orteil	S1			Flexion plantaire de cheville	S2				S3				S4-5				<p>0 = paralysie totale 1 = contraction visible ou palpable 2 = mouvement actif sans pesanteur 3 = mouvement actif contre pesanteur 4 = mouvement actif contre résistance 5 = mouvement normal NT, non testable</p> <p>Score «motricité» : /100 Contraction anale : oui/non</p>	<p>Date de l'examen</p> <p>Niveau neurologique* (Sensitif droite <input type="checkbox"/> gauche <input type="checkbox"/> (Moteur droite <input type="checkbox"/> gauche <input type="checkbox"/></p> <p>*Segment le plus caudal ayant une fonction normale</p> <p>Lésion médullaire***: Complète ou incomplète</p> <p>** Caractère incomplet défini par une motricité ou une sensibilité du territoire S4-S5</p> <p>Échelle d'anomalie ASIA : A B C D E</p> <p>A = complète : aucune motricité ou sensibilité dans le territoire S4-S5 B = incomplète : la sensibilité mais pas la motricité est préservée au-dessous du niveau lésionnel, en particulier dans le territoire S4-S5 C = incomplète : la motricité est préservée au-dessous du niveau lésionnel et plus de la moitié des muscles testés au-dessous de ce niveau à un score < 3 D = incomplète : la motricité est préservée au-dessous du niveau lésionnel et au moins la moitié des muscles testés au-dessous du niveau à un score < 3 E = normale : la sensibilité et la motricité sont normales</p> <p>Préservation partielle*** (Sensitif droite <input type="checkbox"/> gauche <input type="checkbox"/> (Moteur droite <input type="checkbox"/> gauche <input type="checkbox"/></p> <p>*** Extension caudale des segments partiellement innervés</p> <p>Syndrôme clinique : Centromédullaire <input type="checkbox"/> Brown-Sequard <input type="checkbox"/> Moelle antérieure <input type="checkbox"/> Cône terminal <input type="checkbox"/></p>	<p>Score «toucher» : /112 Score «piqûre» : /112 Sensibilité anale : oui/non</p>																																																									
	D	G																																																																																																																																																																														
C2																																																																																																																																																																																
C3																																																																																																																																																																																
C4																																																																																																																																																																																
C5			Flexion du coude																																																																																																																																																																													
C6			Extension du poignet																																																																																																																																																																													
C7			Extension du coude																																																																																																																																																																													
C8			Flexion du médus (P3)																																																																																																																																																																													
T1			Abduction du 5 ^e doigt																																																																																																																																																																													
T2																																																																																																																																																																																
T3																																																																																																																																																																																
T4																																																																																																																																																																																
T5																																																																																																																																																																																
T6																																																																																																																																																																																
T7																																																																																																																																																																																
T8																																																																																																																																																																																
T9																																																																																																																																																																																
T10																																																																																																																																																																																
T11																																																																																																																																																																																
T12																																																																																																																																																																																
L1																																																																																																																																																																																
L2			Flexion de la hanche																																																																																																																																																																													
L3			Extension du genou																																																																																																																																																																													
L4			Dorsiflexion de cheville																																																																																																																																																																													
L5			Extension du gros orteil																																																																																																																																																																													
S1			Flexion plantaire de cheville																																																																																																																																																																													
S2																																																																																																																																																																																
S3																																																																																																																																																																																
S4-5																																																																																																																																																																																
<p>Évaluation sensitive</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 10%; text-align: center;">D</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">G</td> <td style="width: 5%;"></td> <td style="width: 10%; text-align: center;">D</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">G</td> </tr> <tr><td>C2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>L1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>L2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>L3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>L4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>L5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S4-5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>			D	G		D	G	C2						C3						C4						C5						C6						C7						C8						T1						T2						T3						T4						T5						T6						T7						T8						T9						T10						T11						T12						L1						L2						L3						L4						L5						S1						S2						S3						S4-5						<p>0 = absente 1 = diminuée 2 = normale NT, non testable</p>
	D	G		D	G																																																																																																																																																																											
C2																																																																																																																																																																																
C3																																																																																																																																																																																
C4																																																																																																																																																																																
C5																																																																																																																																																																																
C6																																																																																																																																																																																
C7																																																																																																																																																																																
C8																																																																																																																																																																																
T1																																																																																																																																																																																
T2																																																																																																																																																																																
T3																																																																																																																																																																																
T4																																																																																																																																																																																
T5																																																																																																																																																																																
T6																																																																																																																																																																																
T7																																																																																																																																																																																
T8																																																																																																																																																																																
T9																																																																																																																																																																																
T10																																																																																																																																																																																
T11																																																																																																																																																																																
T12																																																																																																																																																																																
L1																																																																																																																																																																																
L2																																																																																																																																																																																
L3																																																																																																																																																																																
L4																																																																																																																																																																																
L5																																																																																																																																																																																
S1																																																																																																																																																																																
S2																																																																																																																																																																																
S3																																																																																																																																																																																
S4-5																																																																																																																																																																																

18.3 ECHELLE D'ASHWORTH MODIFIEE

Source : collège des enseignants de Médecine Physique et de Réadaptation

0 : pas d'augmentation du tonus musculaire.

1 : légère augmentation du tonus musculaire avec simple "sensation d'accrochage" ou minime résistance en fin de course.

1 + : légère augmentation du tonus musculaire avec simple "sensation d'accrochage" suivi d'une minime résistance au cours de la première moitié de la course musculaire.

2 : augmentation importante du tonus musculaire durant toute la course musculaire mais le segment du membre reste facilement mobilisable.

3 : augmentation considérable du tonus musculaire. Le mouvement passif est difficile.

4 : hypertonie majeure. Mouvement passif impossible.

Echelle d'Ashworth modifiée			
Articulations	Groupes musculaires	Droit	Gauche
Hanche	Fléchisseurs		
	Extenseurs		
	Rotateurs internes		
	Rotateurs externes		
	Abducteurs		
	Adducteurs		
Genoux	Ischiojambiers		
	Quadriceps		
Epaule	Fléchisseurs		
	Extenseurs		
	Rotateurs internes		
	Rotateurs externes		
	Abducteurs		
	Adducteurs		
Coudes	Fléchisseurs		
	Extenseurs		
	Pronateurs		
	Supinateurs		

18.4 INFECTIONS PENDANT LE SEJOUR EN REANIMATION

Infection numéro	Localisation - pulmonaire - urinaire - cutanée/cathéter - ostéo-articulaire - méningée	Sévérité - mineure - modérée - majeure	Noms des bactéries identifiées
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			

18.5 TEST DE GALVESTON ORIENTATION AND AMNESIA TEST (GOAT)

Source : collège des enseignants de Médecine Physique et de Réadaptation

Instruction : un score de 78 ou plus, obtenu 3 fois consécutives, indique que le patient est sorti de la période d'amnésie post-traumatique.

76-100 = normal

66-75 = limite

≤65 = altéré

Questions		Score des erreurs	Notes
Comment vous appelez vous ?	-2		Nom et prénom
Quelle est votre date de naissance?	-4		Donner le jour, le mois, l'année
Où êtes-vous maintenant ?			
Ville ?	-5		
Bâtiment ?	-5		
Quand avez-vous été admis ?	-5		Date
Comment y êtes-vous venu ?	-5		Mode de transport
Quel est votre premier souvenir après l'accident ?	-5		Tout évènement plausible suffit
Quel détail pouvez-vous donner ?	-5		Doit donner un détail significatif
Pouvez-vous décrire le dernier évènement dont vous vous souvenez avant l'accident ?	-5		Tout évènement significatif
Quelle heure est-il maintenant ?	-5		-1 pour une erreur d'une demi-heure, etc.
Quel jour de la semaine ?	-3		-1 pour une erreur d'un jour, etc.
Quelle date sommes-nous ? (donner le jour du mois)	-5		-1 pour une erreur d'un jour.
Quel mois ?	-15		-5 pour une erreur d'un mois, etc.
Quelle année ?	-30		-10 pour une erreur de 1 an
Score total (100-total des erreurs) =			On peut obtenir un score négatif

18.6 GLASGOW OUTCOME SCALE AND EXTENDED GLASGOW OUTCOME SCALE (INTERVIEW),
SOURCE : COLLEGE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION

Source : collège des enseignants de Médecine Physique et de Réadaptation

Glasgow Outcome Scale and Extended Glasgow Outcome Scale (interview)

La Glasgow Outcome Scale (GOS) et sa version étendue (GOSE) sont des échelles de devenir global des traumatisés crâniens*. La GOS est une échelle qui propose 5 situations différentes allant de:

- Bonne récupération: **GOS 1**
- Handicap modéré (une certaine indépendance existe): **GOS 2**
- Handicap sévère (conscience du handicap): **GOS 3**
- État végétatif persistant: **GOS 4**
- Au décès: **GOS 5**.

La GOSE, version étendue, comporte 8 degrés en déclinant en deux les handicaps sévères, modérés et la bonne récupération.

Nous proposons ici la traduction française (Fayol et al, 2004) de l'entretien, qui a été élaborée quelques années plus tôt par Wilson et al. Cette échelle est validée en France chez des patients à partir de 16 ans, mais son utilisation en pratique est plus large.

Il est recommandé de se référer au document principes (Fayol et al., 2004).

* Il est à noter que dans la littérature anglo-saxonne, l'ordre est inversé: le décès est coté 1 et la bonne récupération est notée 5.

ENTRETIEN STRUCTURÉ POUR L'ÉCHELLE DE DEVENIR DE GLASGOW (GOS)

Nom: Prénom: Date de l'examen:
 Date de naissance: Date de l'accident: Sexe: I M I F
 Âge à la date de l'accident: Délai depuis l'accident:
 Interlocuteur:
 - Patient seul: - Parent / Ami / Réfèrent seul: - Patient + Parent / Ami / Réfèrent:
 Examineur: Résultat:

Conscience

1 Le sujet est-il capable de répondre aux ordres simples ou de dire un mot? Oui Non

(4)

Indépendance au domicile

2a Le sujet est-il capable de se prendre en charge à domicile, sans aide, pendant 24 heures si nécessaire? Oui Non

Pour répondre "Oui" le sujet doit être capable de se prendre en charge dans les différentes activités de la vie quotidienne pendant 24 heures si nécessaire, même si en ce moment ce n'est pas le cas. Ceci comprend la capacité à planifier et à mener à bien les activités suivantes: toilette, habillage, préparation d'un repas pour soi-même, réponse au téléphone et résolution des problèmes domestiques mineurs. Le sujet doit être capable d'exécuter ces activités sans incitation ni rappel et peut être laissé seul durant la nuit. (3)

2c Avant le traumatisme, le sujet était-il capable de se prendre en charge? Oui Non

Indépendance en dehors du domicile

3a Le sujet est-il capable de faire ses courses sans aide? Oui Non
Ceci inclut la capacité de planifier les achats, de les payer, et de se comporter de façon appropriée en public. Si le sujet ne fait pas habituellement ses courses, répondre à la question comme s'il avait à les faire. (3)

3b Avant le traumatisme, le sujet était-il capable de faire ses courses sans aide? Oui Non

4a Le sujet est-il capable de se déplacer dans la localité sans aide? Oui Non
le sujet peut conduire, utiliser les transports en commun ou prendre un taxi
(le commander par téléphone, donner les instructions au chauffeur). (3)

4b Avant le traumatisme, le sujet était-il capable de se déplacer dans la localité sans aide? Oui Non

Travail

5a le sujet est-il capable actuellement de travailler à son niveau antérieur? Oui Non
Si le sujet était à la recherche d'un travail avant le traumatisme, répondre "Oui"
si le traumatisme n'a pas affecté ses chances d'obtenir un travail ou le niveau de travail qu'il pouvait espérer. (2)
Si le sujet était étudiant avant le traumatisme, répondre "Oui" si sa capacité à suivre des études n'a pas été affectée.

5c Avant le traumatisme, le sujet avait-il un travail ou était-il à la recherche d'un emploi (répondre "Oui") ou ni l'un ni l'autre (répondre "Non")? Oui Non

Vie sociale et loisirs

6a Le sujet est-il capable de poursuivre des relations sociales régulières et d'avoir des activités de loisirs en dehors du domicile? Oui Non

Si le sujet n'a pas repris toutes ses activités de loisirs, mais qu'il n'est pas gêné par des difficultés physiques ou mentales, répondre "Oui".
S'il a arrêté ses activités en raison d'un manque d'intérêt ou de motivation répondre "Non".
Si vous avez répondu "Oui", ne répondez pas à la question 6b.

6b Importance de la restriction des activités sociales ou de loisirs par rapport à avant le traumatisme: 1 2

 1) participe un peu moins; moins de deux fois moins souvent, (1) (2)
 2) participe beaucoup moins; plus de 2 fois moins souvent.

6c Avant le traumatisme, le sujet prenait-il part à des activités sociales régulières et à des activités de loisirs en dehors du domicile? Oui Non

Famille et amis

7a Y a-t-il eu des problèmes psychologiques ayant conduit à des ruptures familiales ou amicales toujours présentes actuellement? Oui Non

Les modifications typiques de la personnalité post-traumatique sont : l'impulsivité, l'irritabilité, l'anxiété, l'indifférence à autrui, les changements d'humeur, la dépression et le comportement irresponsable ou enfantin.

Si vous avez répondu "Non", ne répondez pas à la question 7b.

7b Importance des ruptures ou des tensions : 1 2
1) occasionnelles; moins d'une fois par semaine, (1) (2)
2) fréquentes; une fois par semaine ou plus mais tolérable.

7c Avant le traumatisme y avait-il des problèmes avec la famille ou les amis? Oui Non
Si tel était le cas mais si ces problèmes se sont aggravés de façon marquée, répondre quand même "Non".

Épilepsie:

Depuis le traumatisme le sujet a-t-il présenté des crises d'épilepsie? oui non

Lui a-t-on dit qu'il risquait de faire des crises d'épilepsie? oui non

Quel est le facteur le plus important du devenir?

Le traumatisme crânien: Un traumatisme non crânien ou une maladie: Un mélange des deux:

Cotation:

le score global du patient est basé sur l'indication de la catégorie de devenir la moins bonne.

Reportez-vous aux recommandations pour plus amples informations concernant la passation de l'entretien et la cotation.

Bonne récupération 1

Handicap modéré 2

Handicap sévère 3

État végétatif persistant 4

(Décès) 5

18.7 EXAMEN DES AMPLITUDES PASSIVES

Examen des amplitudes passives			
Articulations	Groupes musculaires	Droit	Gauche
Hanche	Fléchisseurs		
	Extenseurs		
	Rotateurs internes		
	Rotateurs externes		
	Abducteurs		
	Adducteurs		
Genoux	Fléchisseurs		
	Extenseurs		
Epaule	Fléchisseurs		
	Extenseurs		
	Rotateurs internes		
	Rotateurs externes		
	Abducteurs		
	Adducteurs		
Coudes	Fléchisseurs		
	Extenseurs		
	Pronateurs		
	Supinateurs		

18.8 INDEX DE BARTHEL

Source : collège des enseignants de Médecine Physique et de Réadaptation

Cet index est fiable, sensible et reproductible, ce qui en fait un outil de référence.

Cet indice comporte 10 items (relatant, appareil par appareil, les activités de la vie quotidienne), chacun étant coté de 0, 5, 10 ou 15 (pour seulement deux d'entre eux). Le score final correspond à la somme des nombres obtenus par chaque item. Le chiffre 100 équivaut à un score d'indépendance complète.

Coter 0 si l'activité est impossible.

Alimentation

- | | | |
|----|--|--------------------------|
| 10 | Indépendant. Capable de se servir des instruments nécessaires.
Prend ses repas en un temps raisonnable. | <input type="checkbox"/> |
| 5 | À besoin d'aide par exemple pour couper. | <input type="checkbox"/> |
| 0 | Dépendance. | <input type="checkbox"/> |

Contrôle sphinctérien

- | | | |
|----|--|--------------------------|
| 10 | Continence. | <input type="checkbox"/> |
| 5 | Fuites occasionnelles. | <input type="checkbox"/> |
| 0 | Incontinence ou prise en charge personnelle si sonde vésicale à demeure. | <input type="checkbox"/> |

Anorectal

- | | | |
|----|--|--------------------------|
| 10 | Continence. Capable de s'administrer un lavement ou un suppositoire. | <input type="checkbox"/> |
| 5 | Accidents occasionnels. À besoin d'aide pour un lavement ou un suppositoire si nécessaire. | <input type="checkbox"/> |
| 0 | Incontinence | <input type="checkbox"/> |

W.C.

- | | | |
|----|-------------------------------------|--------------------------|
| 10 | Indépendance. | <input type="checkbox"/> |
| 5 | Intervention d'une tierce personne. | <input type="checkbox"/> |
| 0 | Dépendance. | <input type="checkbox"/> |

Soins personnels

- | | | |
|---|----------------------|--------------------------|
| 5 | Possible sans aide. | <input type="checkbox"/> |
| 0 | Dépendance complète. | <input type="checkbox"/> |

Bain		
5	Possible sans aide.	<input type="checkbox"/>
0	Dépendance complète.	<input type="checkbox"/>

Habillage		
10	Indépendance (pour boutonner un bouton, fermer une fermeture éclair, lacer ses lacets, mettre des bretelles).	<input type="checkbox"/>
5	A besoin d'aide, mais fait la moitié de la tâche en un temps correct.	<input type="checkbox"/>
0	Dépendance complète.	<input type="checkbox"/>

Transfert du lit au fauteuil		
15	Indépendant, y compris pour faire fonctionner un fauteuil roulant.	<input type="checkbox"/>
10	Peut s'asseoir mais doit être installé.	<input type="checkbox"/>
5	Capable de s'asseoir, mais nécessite une aide maximale pour le transfert.	<input type="checkbox"/>
0	Incapacité totale.	<input type="checkbox"/>

Déplacements		
15	Marche avec soutien ou pas, pour faire plus de 50 mètres.	<input type="checkbox"/>
10	Marche avec aide pour faire 50 mètres.	<input type="checkbox"/>
5	Indépendant pour faire 50 mètres en fauteuil roulant.	<input type="checkbox"/>
0	Dépendance complète.	<input type="checkbox"/>

Escaliers		
10	Indépendant, peut se servir de cannes.	<input type="checkbox"/>
5	A besoin d'aide ou de surveillance.	<input type="checkbox"/>
0	Incapacité totale.	<input type="checkbox"/>

Score total

19. CONSENTEMENTS, EXEMPLE

Titre complet de recherche :

**« Incidence des paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) dans une population de traumatisés crâniens et de blessés médullaires et marqueurs spécifiques du développement précoce de POAN »
« BENTHOS »**

**Cette recherche est promue par l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris
Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation
1 avenue Claude Vellefaux
75010 Paris**

NOTE D'INFORMATION

Madame, Monsieur,

Le Docteur (nom, prénom), exerçant à l'hôpital, propose à Mme, M. (barrée les mentions inutiles) (nom, prénom), de participer à une recherche concernant son état de santé.

En raison de son état qui le/la rend incapable d'exprimer son consentement, et conformément à la loi, c'est à vous, compte tenu des relations que vous entretenez avec lui/elle, que nous demandons l'autorisation de participation à cette recherche.

Il est important de lire attentivement cette note avant de prendre votre décision ; n'hésitez pas à lui demander des explications.

Si vous décidez de la participation de votre proche à cette recherche, un consentement écrit vous sera demandé.

1) Quel est le but de cette recherche ?

Cette recherche porte sur la création d'une banque de données cliniques et de liquides biologiques qui a terme permettra d'identifier les patients à risque de développer des paraostéoarthropathies neurogènes grâce à des marqueurs précoces.

Pour répondre à la question posée dans la recherche, il est prévu d'inclure l'ensemble des personnes présentant un traumatisme crânien grave ou modéré dans le cadre d'un polytraumatisme et les patients avec lésion complète de la moelle épinière, dans un seul établissement de soins, situés dans le centre hospitalier universitaire de Beaujon.

2) En quoi consiste la recherche ?

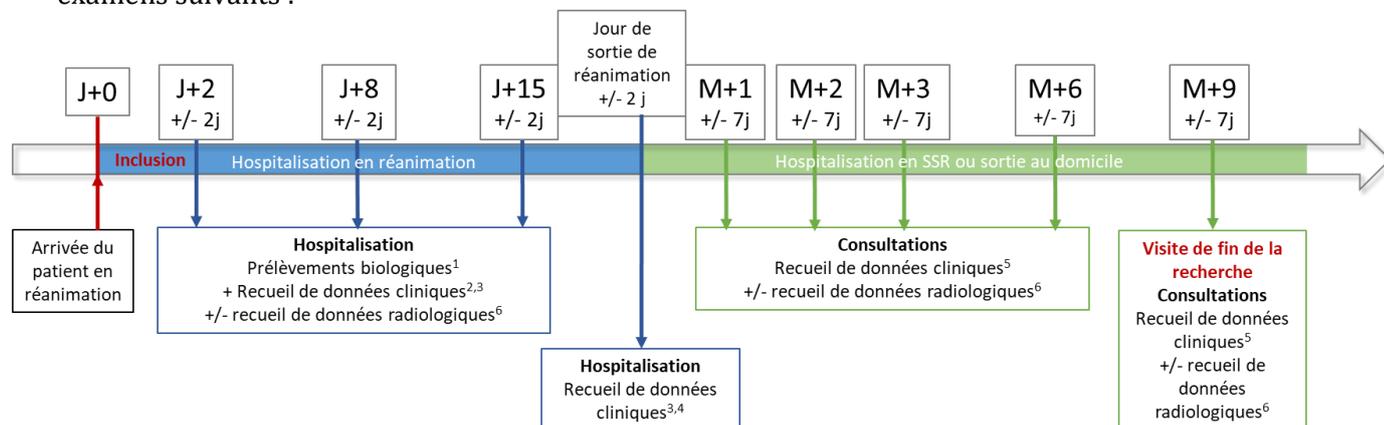
Dans la recherche proposée, nous allons évaluer l'incidence de survenue de paraostéarthropathies neurogènes et procéder à un recueil de données cliniques et biologiques. Votre proche bénéficiera de prélèvements de sang, urines et si possible, de liquide céphalorachidien ainsi que d'un suivi médical rapproché pour collecter des données cliniques et détecter précocement l'apparition éventuelle d'une paraostéarthropathie neurogène.

3) Quel est le calendrier de la recherche ?

La durée prévisionnelle de la recherche est de 3 années et votre participation sera de 1 année. Après votre inclusion, le déroulement de la recherche a été le suivant :

- Votre proche aura des prélèvements de sang, de selles et d'urines à J+2, J+8 et J+15 dès son arrivée en réanimation. Ces prélèvements seront réalisés en même temps que les examens de routines. Des tubes supplémentaires seront collectés dans le but de la recherche,
- Des prélèvements de liquide céphalorachidien pourront être effectués aux mêmes dates seulement en depuis une dérivation ventriculaire externe, lors d'une ponction lombaire faite dans un cadre diagnostique ou lors d'un prélèvement de routine au bloc opératoire. L'ensemble de ces examens biologiques seront prélevés lors des prélèvements habituellement réalisés dans le service et ils ne seront jamais réalisés uniquement dans le cadre de ce protocole.
- Nous collecterons également des données cliniques tout au long du séjour en réanimation puis à J+15, M1, M2, M3, M6 et M9 +/- 7 jours de son entrée en réanimation, lors de courtes consultations de suivis.
- Si votre proche est hospitalisé en soins de suites et de réadaptation en région parisienne, nous viendrons à sa rencontre pour réaliser ce recueil de données. Si votre proche est retourné au domicile, nous le convoquerons en consultation sur le site de l'hôpital Raymond Poincaré.
- En cas de suspicion clinique de paraostéarthropathies neurogènes lors d'une de ces consultations, nous réaliserons une imagerie (échographie ou angioscanner) dans le service de radiologie de l'hôpital Raymond Poincaré.

Selon le moment où vous lirez cette note d'information votre proche aura reçu ou recevra les examens suivants :



4) Quels sont les bénéfices liés à la participation de votre proche ?

Les patients inclus dans cette étude bénéficieront d'un suivi clinique rapproché l'année suivant l'inclusion. La suspicion de paraostéarthropathies neurogènes débouchera sur la réalisation d'une imagerie diagnostique et une prise en charge spécifique si le diagnostic est avéré. Ce suivi permettra également de dépister d'autres anomalies liées au handicap (déformations neuro-orthopédiques, escarres...). Votre proche recevra alors une prise en charge ou sera orienté vers une autre structure experte afin de permettre des soins adaptés.

Par ailleurs, votre proche contribuera à une meilleure connaissance des paraostéarthropathies neurogènes.

5) Quels sont les traitements autorisés et non autorisés ?

La transfusion de plus de 4 culots globulaires contre indique l'inclusion de patients dans notre étude. En effet, il ne paraît pas raisonnable de réaliser des prélèvements sanguins à un sujet anémié et nécessitant d'être transfusé.

6) Quels sont les risques et les contraintes prévisibles ajoutés par la recherche ?

Les risques prévisibles pour les patients inclus dans cette étude pourraient être liés :

- Aux prélèvements supplémentaires de liquides biologiques effectués pour la recherche. C'est pour cela que les patients en choc hémorragique ou ayant reçu plus de 4 culots globulaires seront logiquement exclus de cette étude,
- Le prélèvement sanguin peut entraîner une sensation désagréable transitoire au moment de la piqûre, ainsi qu'un hématome au point de ponction,
- A la contrainte que peut imposer les consultations de suivi pour recueil des données cliniques. Dans le but de réduire les déplacements de patients et le nombre de perdu de vue, il était important de restreindre notre population aux sujets vivant en région parisienne. Par ailleurs, les recueils de données seront réalisés sur le lieu d'hospitalisation du patient tant que celui-ci sera hospitalisé. Une fois rentré au domicile ou en institution, le patient sera vu en consultation de médecine physique et de réadaptation sur l'hôpital Raymond Poincaré.

Si vous acceptez que votre proche participe, vous devrez veiller à ce qu'il/elle respecte les points suivants :

- Venir aux rendez-vous. En cas d'impossibilité, nous vous remercions de contacter son médecin le plus rapidement possible.
- Suivre les recommandations du médecin relatif à sa participation à l'étude.
- Informer le médecin de la recherche, de l'utilisation de tout traitement ainsi que de tout événement survenant pendant la recherche (hospitalisation, grossesse, prélèvement sanguin réalisé au cours du dernier mois sauf si aucun prélèvement de sang n'est prévu dans la recherche ...).
- Ne pas prendre part à un autre projet de recherche sans l'accord du médecin, ceci pour le/la protéger de tout accident possible pouvant résulter par exemple d'incompatibilités possibles entre les thérapeutiques étudiées ou d'autres dangers
- Être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou être bénéficiaire d'un tel régime.

7) Que vont devenir les prélèvements effectués pour la recherche ?

Les échantillons prélevés dans le cadre de la recherche proviendront de :

- Prélèvements de sang, de selles et d'urines à J+2, J+8 et J+15 +/- 7 jours. Ces prélèvements seront réalisés en même temps que les examens de routines. Des tubes supplémentaires seront collectés dans le but de la recherche.
- Prélèvements de liquide céphalorachidien aux mêmes dates si réalisables : présence d'une dérivation ventriculaire externe, lors d'une ponction lombaire faite dans un cadre diagnostique, prélèvement de routine au bloc opératoire.
- L'ensemble de ces examens biologiques seront prélevés lors des prélèvements habituellement réalisés dans le service et ils ne seront jamais réalisés uniquement dans le cadre de ce protocole.

A l'issue de la recherche, les échantillons pourront être utilisés pour des analyses ultérieures non

prévues dans le protocole pouvant se révéler intéressantes dans le cadre de la pathologie et en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques notamment en recherche fondamentale, sous réserve que le patient de n'y soit pas opposé, après en avoir été informé, comme indiqué dans le formulaire de consentement.

Pendant la recherche, les collections seront conservées au laboratoire du Centre de ressources biologiques de Bichat (CRB) (Hôpital Bichat, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris) sous la responsabilité de Mme HUART Virginie et Dr TUBIANA Sarah pendant une durée totale de 2 ans. Les échantillons seront conservés dans un congélateur à -80°C.

A la fin de la recherche, les échantillons seront transférés au laboratoire de l'unité de recherche UMR-S/MD1197, IRBA-CTSA, Hôpital Percy, 1 Rue du Lieutenant Raoul Batany, 92190 Clamart, France pour y être conservés pendant 3 années supplémentaires. Les échantillons seront conservés dans un congélateur à -80°C.

Il n'y aura pas d'examen des caractéristiques génétiques.

Vous avez la possibilité à tout moment de demander au médecin qui suit votre proche dans le cadre de la recherche, la destruction de ces prélèvements biologiques ou de vous opposer à toute utilisation ultérieure.

8) Quels sont les éventuelles alternatives médicales ?

En cas de non-participation à la recherche, votre proche bénéficiera d'une prise en charge en soins de suite et réadaptation pour bénéficier de rééducation. A la sortie, un suivi clinique en consultation peut être instauré mais n'est pas systématique. En cas de suspicion clinique de développement de para-ostéoarthropathies neurogènes, le médecin suspectant cliniquement le diagnostic peut demander un examen d'imagerie puis adresser votre proche en consultation chirurgicale. Cette complication étant peut connue, il est classique d'avoir un retard diagnostique et de prise en charge chez les patients non suivis par des équipes spécialisées en handicap neurologique.

9) Quelles sont les modalités de prise en charge médicale à la fin de la participation de votre proche ?

Notre étude étant observationnelle et ne portant pas sur l'utilisation d'un traitement mais uniquement sur du recueil de données cliniques et biologiques, en cas d'arrêt de l'étude, il n'y aura aucune conséquence pour votre proche. Le suivi en consultation avec un médecin de Médecine Physique et de Réadaptation se poursuivra tant que cela est nécessaire.

Le médecin pourra décider à tout moment de l'arrêt de la participation de votre proche ; il vous en expliquera les raisons.

10) Si votre proche participe, comment vont être traitées les données recueillies pour la recherche ?

Dans le cadre de la recherche à laquelle l'AP-HP propose à votre proche de participer, un traitement de ses données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'en analyser les résultats.

A cette fin, les données médicales le/la concernant et les données relatives à ses habitudes de vie, ainsi que, ses origines ethniques, seront transmises au Promoteur ou aux personnes ou partenaires agissant pour son compte, en France et conservées pendant 15 ans. Ces données seront identifiées par un numéro d'enregistrement. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises.

Le fichier informatique utilisé pour cette recherche est mis en œuvre conformément à la réglementation française (loi Informatique et Libertés modifiée) et européenne (au Règlement Général sur la Protection des Données -RGPD), Vous disposez d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition au traitement des données couvertes par le secret professionnel utilisées dans le cadre de cette recherche. Ces droits s'exercent auprès du médecin en charge de la recherche qui seul connaît son identité (identifié en première page du présent document).

Si vous décidez d'arrêter sa participation à la recherche, les données recueillies précédemment à cet arrêt seront utilisées conformément à la réglementation, et exclusivement pour les objectifs de cette recherche. En effet, leur effacement serait susceptible de compromettre la validité des résultats de la recherche. Dans ce cas, ses données ne seront absolument pas utilisées ultérieurement ou pour une autre recherche.

En cas de difficultés dans l'exercice de vos droits, vous pouvez saisir le Délégué à la Protection des données de l'AP-HP à l'adresse suivante : protection.donnees.dsi@aphp.fr, qui pourra notamment vous expliquer les voies de recours dont vous disposez auprès de la CNIL.

11) Comment cette recherche est-elle encadrée ?

L'AP-HP a pris toutes les mesures pour mener cette recherche conformément aux dispositions du Code de la Santé Publique applicables aux recherches impliquant la personne humaine.

L'AP-HP a souscrit une assurance (N° d'adhésion) garantissant sa responsabilité civile et celle de tout intervenant auprès de la compagnie HDI-GERLING par l'intermédiaire de BIOMEDICINSURE dont l'adresse est Parc d'Innovation Bretagne Sud C.P.142 56038 Vannes Cedex.

L'AP-HP a obtenu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes pour cette recherche [indiquer le nom du CPP] le [indiquer la date de la séance au format jj /mm /aaaa]

12) Quels sont les droits de votre proche ?

La participation de votre proche à cette recherche est entièrement libre et volontaire. Votre décision n'entraînera aucun préjudice sur la qualité des soins et des traitements qu'il/elle est en droit d'attendre.

Vous pourrez tout au long de la recherche demander des informations concernant la santé de votre proche ainsi que des explications sur le déroulement de la recherche au médecin qui le/la suit.

Vous pouvez retirer à tout moment la participation de votre proche à la recherche sans justification, sans conséquence sur la suite de son traitement ni la qualité des soins qui lui seront fournis et sans conséquence sur la relation avec son médecin. A l'issue de ce retrait, il/elle pourra être suivi par la même équipe médicale. Dans ce cas, les données collectées jusqu'au retrait seront utilisées pour l'analyse des résultats de la recherche.

Le dossier médical de votre proche restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de son traitement ainsi que par les autorités de santé et par des personnes dûment mandatées par l'AP-HP pour la recherche et soumises au secret professionnel.

A l'issue de la recherche et après analyse des données relatives à cette recherche, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux en le demandant au médecin qui suit votre proche dans le cadre de cette recherche

Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de ses données médicales en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique.

Après avoir lu toutes ces informations, discuté tous les aspects avec le médecin, si vous acceptez que votre proche participe à la recherche vous devrez signer et dater le formulaire de consentement éclairé se trouvant à la fin de ce document.



FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Je soussigné(e), M^{me}, M. [rayer les mentions inutiles] (nom, prénom).....**accepte librement en qualité de personne de confiance*, proche**, parent** [rayer les mentions inutiles] **que** M^{me}, M. [rayer les mentions inutiles] (nom, prénom)..... **participe à la recherche intitulée « « Incidence des paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) dans une population de traumatisés crâniens et de blessés médullaires et marqueurs spécifiques du développement précoce de POAN », « BENTHOS »** organisée par l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris et qui m'est proposée par le Docteur/Professeur/Personne qualifiée (nom, prénom, téléphone), médecin dans cette recherche.

- J'ai pris connaissance de la note d'information **version 1-0 du 21/02/2019 [5 page]** m'expliquant l'objectif de cette recherche, la façon dont elle va être réalisée et ce que la participation de mon/ma proche va impliquer,
- je conserverai un exemplaire de la note d'information et du consentement,
- j'ai reçu des réponses adaptées à toutes mes questions,
- j'ai disposé d'un temps suffisant pour prendre ma décision,
- j'ai compris que la participation de mon/ma proche est libre et que je pourrai interrompre sa participation à tout moment, sans encourir la moindre responsabilité et préjudice pour la qualité des soins qui lui seront prodigués.
- j'ai été informé(e) que les données recueillies dans le cadre de la recherche peuvent être réutilisées pour des recherches ultérieures, et que je pouvais m'y opposer à tout moment
- Je suis conscient(e) que la participation de mon/ma proche pourra aussi être interrompue par le médecin si besoin, il m'en expliquera les raisons,
- j'ai compris que pour pouvoir participer à cette recherche mon/ma proche doit être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime. Je confirme que c'est le cas,
- j'ai bien été informé(e) que la participation de mon/ma proche à cette recherche durera 12 mois,
- j'ai été informé(e) que ses échantillons, prélevés dans le cadre de cette recherche, seront conservés et utilisés ultérieurement à des fins de recherche portant sur les paraostéoarthropathies neurogènes,

VIII. Références bibliographiques de la thèse

- [1] Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 2013;242:909–22. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23992>.
- [2] Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008334. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>.
- [3] Torossian F, Guerton B, Anginot A, Alexander KA, Desterke C, Soave S, et al. Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications. *JCI Insight* 2017;2. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96034>.
- [4] Foley KL, Hebela N, Keenan MA, Pignolo RJ. Histopathology of periarticular non-hereditary heterotopic ossification. *Bone* 2018;109:65–70. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.12.006>.
- [5] Meyers C, Lisiecki J, Miller S, Levin A, Fayad L, Ding C, et al. Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review. *JBMR Plus* 2019;3:e10172. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10172>.
- [6] Kornhaber R, Foster N, Edgar D, Visentin D, Ofir E, Haik J, et al. The development and impact of heterotopic ossification in burns: a review of four decades of research. *Scars Burns Heal* 2017;3:2059513117695659. <https://doi.org/10.1177/2059513117695659>.
- [7] Forsberg JA, Pepek JM, Wagner S, Wilson K, Flint J, Andersen RC, et al. Heterotopic ossification in high-energy wartime extremity injuries: prevalence and risk factors. *J Bone Joint Surg Am* 2009;91:1084–91. <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.00792>.
- [8] Potter BK, Forsberg JA, Davis TA, Evans KN, Hawksworth JS, Tadaki D, et al. Heterotopic ossification following combat-related trauma. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92 Suppl 2:74–89. <https://doi.org/10.2106/JBJS.J.00776>.
- [9] Taam I, Boussouni K, Redouane B, Amil T, Saouab R. [Myositis ossificans circumscripta, an unusual location: about a case and review of the literature]. *Pan Afr Med J* 2016;24:71. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.71.9043>.
- [10] Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med* 2005;37:129–36. <https://doi.org/10.1080/16501970510027628>.
- [11] Dejerine-Klumpke A, Ceillier A. Paraostéopathies des paraplégiques par lésion médullaire. Etude clinique et radiologique. 1918:497–535.
- [12] Dejerine A, Ceillier A, Dejerine Y. Paraostéopathies des paraplégiques par lésion médullaire. Etude anatomique et histologique. 1919:399–407.
- [13] Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:518–27. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.122>.
- [14] Wentworth KL, Masharani U, Hsiao EC. Therapeutic advances for blocking heterotopic ossification in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Br J Clin Pharmacol* 2019;85:1180–7. <https://doi.org/10.1111/bcp.13823>.
- [15] Kaplan FS, Glaser DL, Hebela N, Shore EM. Heterotopic ossification. *J Am Acad Orthop Surg* 2004;12:116–25.
- [16] Medina A, Shankowsky H, Savaryn B, Shukalak B, Tredget EE. Characterization of heterotopic ossification in burn patients. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc* 2014;35:251–6. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3182957768>.
- [17] Ranganathan K, Loder S, Agarwal S, Wong VW, Wong VC, Forsberg J, et al. Heterotopic Ossification: Basic-Science Principles and Clinical Correlates. *J Bone Joint Surg Am* 2015;97:1101–11. <https://doi.org/10.2106/JBJS.N.01056>.
- [18] Xu R, Hu J, Zhou X, Yang Y. Heterotopic ossification: Mechanistic insights and clinical challenges. *Bone* 2018;109:134–42. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.025>.
- [19] Joice M, Vasileiadis GI, Amanatullah DF. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for heterotopic ossification prophylaxis after total hip arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *Bone Jt J* 2018;100-B:915–22. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.100B7.BJJ-2017-1467.R1>.
- [20] Cipriano CA, Pill SG, Keenan MA. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg* 2009;17:689–97.

- [21] Chen H-C, Yang J-Y, Chuang S-S, Huang C-Y, Yang S-Y. Heterotopic ossification in burns: our experience and literature reviews. *Burns J Int Soc Burn Inj* 2009;35:857–62. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.03.002>.
- [22] Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:80. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-80>.
- [23] Rocke DM, Zasloff M, Peeper J, Cohen RB, Kaplan FS. Age- and joint-specific risk of initial heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 1994:243–8.
- [24] Mishima K, Kitoh H, Haga N, Nakashima Y, Kamizono J, Katagiri T, et al. Radiographic characteristics of the hand and cervical spine in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Intractable Rare Dis Res* 2014;3:46–51. <https://doi.org/10.5582/irdr.2014.01009>.
- [25] Kaplan FS, Zasloff MA, Kitterman JA, Shore EM, Hong CC, Rocke DM. Early mortality and cardiorespiratory failure in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:686–91. <https://doi.org/10.2106/JBJS.I.00705>.
- [26] Wentworth KL, Bigay K, Chan TV, Ho JP, Morales BM, Connor J, et al. Clinical-pathological correlations in three patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Bone* 2018;109:104–10. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.10.009>.
- [27] Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho T-J, Choi IH, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet* 2006;38:525–7. <https://doi.org/10.1038/ng1783>.
- [28] Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, et al. A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;407:213–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.001>.
- [29] Hatsell SJ, Idone V, Wolken DMA, Huang L, Kim HJ, Wang L, et al. ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Sci Transl Med* 2015;7:303ra137. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4358>.
- [30] Alessi Wolken DM, Idone V, Hatsell SJ, Yu PB, Economides AN. The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Bone* 2018;109:210–7. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.06.011>.
- [31] Adegbite NS, Xu M, Kaplan FS, Shore EM, Pignolo RJ. Diagnostic and mutational spectrum of progressive osseous heteroplasia (POH) and other forms of GNAS-based heterotopic ossification. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1788–96. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32346>.
- [32] Linglart A, Maupetit-Méhouas S, Silve C. GNAS -Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. *Horm Res Paediatr* 2013;79:119–29. <https://doi.org/10.1159/000348516>.
- [33] Pignolo RJ, Ramaswamy G, Fong JT, Shore EM, Kaplan FS. Progressive osseous heteroplasia: diagnosis, treatment, and prognosis. *Appl Clin Genet* 2015;8:37–48. <https://doi.org/10.2147/TACG.S51064>.
- [34] Min Z, Sharma S, Rivera-Ramirez L. Albright's hereditary osteodystrophy. *Intern Emerg Med* 2014;9:239–40. <https://doi.org/10.1007/s11739-013-1010-2>.
- [35] Bastepe M, Jüppner H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res* 2005;63:65–74. <https://doi.org/10.1159/000083895>.
- [36] Myllylä RM, Haapasaari KM, Palatsi R, Germain-Lee EL, Hägg PM, Ignatius J, et al. Multiple miliary osteoma cutis is a distinct disease entity: four case reports and review of the literature. *Br J Dermatol* 2011;164:544–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10121.x>.
- [37] Ben Hamida KS, Hajri R, Kedadi H, Bouhaouala H, Salah MH, Mestiri A, et al. Myositis ossificans circumscripta of the knee improved by alendronate. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2004;71:144–6. [https://doi.org/10.1016/S1297-319X\(03\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S1297-319X(03)00096-4).
- [38] Tamura S, Hasuo K, Kudo S, Uchino A, Yasumori K, Kawanami T, et al. Atypical arteriographic features of myositis ossificans circumscripta (MOC). *Radiat Med* 1992;10:154–6.
- [39] Parikh J, Hyare H, Saifuddin A. The imaging features of post-traumatic myositis ossificans,

- with emphasis on MRI. *Clin Radiol* 2002;57:1058–66.
- [40] Kaplan FS, Tabas JA, Zasloff MA. Fibrodysplasia ossificans progressiva: a clue from the fly? *Calcif Tissue Int* 1990;47:117–25.
- [41] Yazici M, Etensel B, Gürsoy MH, Aydoğdu A, Erkuş M. Nontraumatic myositis ossificans with an unusual location: case report. *J Pediatr Surg* 2002;37:1621–2. <https://doi.org/10.1053/jpsu.2002.36196>.
- [42] Baysal T, Baysal O, Sarac K, Elmali N, Kutlu R, Ersoy Y. Cervical myositis ossificans traumatica: a rare location. *Eur Radiol* 1999;9:662–4. <https://doi.org/10.1007/s003300050728>.
- [43] Tyler P, Saifuddin A. The imaging of myositis ossificans. *Semin Musculoskelet Radiol* 2010;14:201–16. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253161>.
- [44] Wu JS, Hochman MG. Soft-tissue tumors and tumorlike lesions: a systematic imaging approach. *Radiology* 2009;253:297–316. <https://doi.org/10.1148/radiol.2532081199>.
- [45] Kransdorf MJ, Meis JM, Jelinek JS. Myositis ossificans: MR appearance with radiologic-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 1991;157:1243–8. <https://doi.org/10.2214/ajr.157.6.1950874>.
- [46] Nishio J, Nabeshima K, Iwasaki H, Naito M. Non-traumatic myositis ossificans mimicking a malignant neoplasm in an 83-year-old woman: a case report. *J Med Case Reports* 2010;4:270. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-4-270>.
- [47] Govindarajan A, Sarawagi R, Prakash ML. Myositis ossificans: the mimicker. *BMJ Case Rep* 2013;2013. <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-201477>.
- [48] Renault E, Favier T, Laumonier F. [Non-traumatic myositis ossificans circumscripta]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr* 1995;2:150–5.
- [49] Konishi E, Kusuzaki K, Murata H, Tsuchihashi Y, Beabout JW, Unni KK. Extraskeletal osteosarcoma arising in myositis ossificans. *Skeletal Radiol* 2001;30:39–43.
- [50] Forsberg JA, Potter BK. Heterotopic ossification in wartime wounds. *J Surg Orthop Adv* 2010;19:54–61.
- [51] Rubin MM, Cozzi GM. Heterotopic ossification of the temporomandibular joint in a burn patient. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg* 1986;44:897–9.
- [52] Munster AM, Bruck HM, Johns LA, Von Prince K, Kirkman EM, Remig RL. Heterotopic calcification following burns: a prospective study. *J Trauma* 1972;12:1071–4. <https://doi.org/10.1097/00005373-197212000-00008>.
- [53] Hunt JL, Arnoldo BD, Kowalske K, Helm P, Purdue GF. Heterotopic ossification revisited: a 21-year surgical experience. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc* 2006;27:535–40. <https://doi.org/10.1097/01.BCR.0000226023.58438.14>.
- [54] Klein MB, Logsetty S, Costa B, Deters L, Rue TC, Carrougher GJ, et al. Extended time to wound closure is associated with increased risk of heterotopic ossification of the elbow. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc* 2007;28:447–50. <https://doi.org/10.1097/BCR.0B013E318053D378>.
- [55] MacG. Jackson D. Destructive burns: Some orthopaedic complications. *Burns* 1980;7:105–22. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(80\)90037-6](https://doi.org/10.1016/0305-4179(80)90037-6).
- [56] Levi B, Jayakumar P, Giladi A, Jupiter JB, Ring DC, Kowalske K, et al. Risk factors for the development of heterotopic ossification in seriously burned adults: A National Institute on Disability, Independent Living and Rehabilitation Research burn model system database analysis. *J Trauma Acute Care Surg* 2015;79:870–6. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000838>.
- [57] Genêt F, Jourdan C, Schnitzler A, Lautridou C, Guillemot D, Judet T, et al. Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PloS One* 2011;6:e16632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016632>.
- [58] Simonsen LL, Sonne-Holm S, Krasheninnikoff M, Engberg AW. Symptomatic heterotopic ossification after very severe traumatic brain injury in 114 patients: incidence and risk factors. *Injury* 2007;38:1146–50. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.03.019>.
- [59] Garland DE, Blum CE, Waters RL. Periarticular heterotopic ossification in head-injured

- adults. Incidence and location. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:1143–6.
- [60] Rosin AJ. Ectopic calcification around joints of paralysed limbs in hemiplegia, diffuse brain damage, and other neurological diseases. *Ann Rheum Dis* 1975;34:499–505.
- [61] Wittenberg RH, Peschke U, Bötel U. Heterotopic ossification after spinal cord injury. Epidemiology and risk factors. *J Bone Joint Surg Br* 1992;74:215–8.
- [62] Genêt F. Stratégies de prise en charge des paraostéoarthropathies après lésion du système nerveux central - problématique de la récurrence post-opératoire. Université de Versailles - Saint-Quentin en Yvelines, 2011.
- [63] Salga M, Jourdan C, Durand M-C, Hangard C, Denormandie P, Carlier R-Y, et al. Sciatic nerve compression by neurogenic heterotopic ossification: use of CT to determine surgical indications. *Skeletal Radiol* 2015;44:233–40. <https://doi.org/10.1007/s00256-014-2003-6>.
- [64] Garland DE. Surgical approaches for resection of heterotopic ossification in traumatic brain-injured adults. *Clin Orthop* 1991;59–70.
- [65] Brady RD, Shultz SR, McDonald SJ, O'Brien TJ. Neurological heterotopic ossification: Current understanding and future directions. *Bone* 2018;109:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.05.015>.
- [66] Wharton GW, Morgan TH. Ankylosis in the paralyzed patient. *J Bone Joint Surg Am* 1970;52:105–12.
- [67] Sullivan MP, Torres SJ, Mehta S, Ahn J. Heterotopic ossification after central nervous system trauma: A current review. *Bone Jt Res* 2013;2:51–7. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.23.2000152>.
- [68] van Kuijk AA, Geurts ACH, van Kuppevelt HJM. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal Cord* 2002;40:313–26. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101309>.
- [69] Varghese G, Williams K, Desmet A, Redford JB. Nonarticular complication of heterotopic ossification: a clinical review. *Arch Phys Med Rehabil* 1991;72:1009–13.
- [70] Colachis SC, Clinchot DM. The association between deep venous thrombosis and heterotopic ossification in patients with acute traumatic spinal cord injury. *Paraplegia* 1993;31:507–12. <https://doi.org/10.1038/sc.1993.82>.
- [71] Perakash A, Sullivan G, Toth L, Bradleigh LH, Linder SH, Perakash I. Persistent hypercoagulation associated with heterotopic ossification in patients with spinal cord injury long after injury has occurred. *Paraplegia* 1993;31:653–9. <https://doi.org/10.1038/sc.1993.105>.
- [72] Genet F, Marmorat J-L, Lautridou C, Schnitzler A, Mailhan L, Denormandie P. Impact of late surgical intervention on heterotopic ossification of the hip after traumatic neurological injury. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91:1493–8. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.91B11.22305>.
- [73] Denormandie P, Kiefer C, Mailhan L, Even-Schneider A, Sorriaux G, Martin J-N, et al. [Surgical treatment of orthopedic deformities due to spasticity in the lower limb]. *Neurochirurgie* 2003;49:339–52.
- [74] Banovac K, Gonzalez F. Evaluation and management of heterotopic ossification in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord* 1997;35:158–62.
- [75] Rosteius T, Suero EM, Grasmücke D, Aach M, Gisevius A, Ohlmeier M, et al. The sensitivity of ultrasound screening examination in detecting heterotopic ossification following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2017;55:71–3. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.93>.
- [76] Amar E, Sharfman ZT, Rath E. Heterotopic ossification after hip arthroscopy. *J Hip Preserv Surg* 2015;2:355–63. <https://doi.org/10.1093/jhps/hnv052>.
- [77] Perosky JE, Peterson JR, Eboda ON, Morris MD, Wang SC, Levi B, et al. Early detection of heterotopic ossification using near-infrared optical imaging reveals dynamic turnover and progression of mineralization following Achilles tenotomy and burn injury. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2014;32:1416–23. <https://doi.org/10.1002/jor.22697>.
- [78] Argyropoulou MI, Kostandi E, Kosta P, Zikou AK, Kastani D, Galiatsou E, et al. Heterotopic ossification of the knee joint in intensive care unit patients: early diagnosis with magnetic resonance imaging. *Crit Care Lond Engl* 2006;10:R152. <https://doi.org/10.1186/cc5083>.

- [79] Carlier RY, Safa DML, Parva P, Mompoin D, Judet T, Denormandie P, et al. Ankylosing neurogenic myositis ossificans of the hip. An enhanced volumetric CT study. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:301–5.
- [80] Tsionos I, Leclercq C, Rochet JM. Heterotopic ossification of the elbow in patients with burns. Results after early excision. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:396–403.
- [81] Sakellariou VI, Grigoriou E, Mavrogenis AF, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2012;12:230–40.
- [82] Ghanem MA, Dannoon S, Elgazzar AH. The added value of SPECT-CT in the detection of heterotopic ossification on bone scintigraphy. *Skeletal Radiol* 2019. <https://doi.org/10.1007/s00256-019-03286-x>.
- [83] Peterson JR, Okagbare PI, De La Rosa S, Cilwa KE, Perosky JE, Eboda ON, et al. Early detection of burn induced heterotopic ossification using transcutaneous Raman spectroscopy. *Bone* 2013;54:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.002>.
- [84] Furman R, Nicholas JJ, Jivoff L. Elevation of the serum alkaline phosphatase coincident with ectopic-bone formation in paraplegic patients. *J Bone Joint Surg Am* 1970;52:1131–7.
- [85] Holavanahalli RK, Helm PA, Parry IS, Dolezal CA, Greenhalgh DG. Select practices in management and rehabilitation of burns: a survey report. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc* 2011;32:210–23. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e31820aadd5>.
- [86] Michelsson JE, Rauschnig W. Pathogenesis of experimental heterotopic bone formation following temporary forcible exercising of immobilized limbs. *Clin Orthop* 1983;265–72.
- [87] Izumi K. Study of ectopic bone formation in experimental spinal cord injured rabbits. *Paraplegia* 1983;21:351–63. <https://doi.org/10.1038/sc.1983.59>.
- [88] Daud O, Sett P, Burr RG, Silver JR. The relationship of heterotopic ossification to passive movements in paraplegic patients. *Disabil Rehabil* 1993;15:114–8.
- [89] Banovac K, Williams JM, Patrick LD, Haniff YM. Prevention of heterotopic ossification after spinal cord injury with indomethacin. *Spinal Cord* 2001;39:370–4. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101166>.
- [90] Zakrasek EC, Yurkiewicz SM, Dirlikov B, Pence BT, Crew JD. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to prevent heterotopic ossification after spinal cord injury: a retrospective chart review. *Spinal Cord* 2019;57:214–20. <https://doi.org/10.1038/s41393-018-0199-3>.
- [91] Aubut J-AL, Mehta S, Cullen N, Teasell RW, ERABI Group, Scire Research Team. A comparison of heterotopic ossification treatment within the traumatic brain and spinal cord injured population: An evidence based systematic review. *NeuroRehabilitation* 2011;28:151–60. <https://doi.org/10.3233/NRE-2011-0643>.
- [92] Banovac K, Sherman AL, Estores IM, Banovac F. Prevention and treatment of heterotopic ossification after spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2004;27:376–82.
- [93] Banovac K, Williams JM, Patrick LD, Levi A. Prevention of heterotopic ossification after spinal cord injury with COX-2 selective inhibitor (rofecoxib). *Spinal Cord* 2004;42:707–10. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101628>.
- [94] Nauth A, Giles E, Potter BK, Nesti LJ, O'Brien FP, Bosse MJ, et al. Heterotopic ossification in orthopaedic trauma. *J Orthop Trauma* 2012;26:684–8. <https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e3182724624>.
- [95] Sautter-Bihl ML, Hültenschmidt B, Liebermeister E, Nanassy A. Fractionated and single-dose radiotherapy for heterotopic bone formation in patients with spinal cord injury. A phase-I/II study. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft Al* 2001;177:200–5.
- [96] Cipriano C, Pill SG, Rosenstock J, Keenan MA. Radiation therapy for preventing recurrence of neurogenic heterotopic ossification. *Orthopedics* 2009;32. <https://doi.org/10.3928/01477447-20090728-33>.
- [97] Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;12–7. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgi003>.
- [98] Patel H, Silverman CL, Carrascosa L, Malkani A, Yashar CM. Evaluation of scrotal and

testicular radiation doses for heterotopic ossification prophylaxis. *Am J Orthop Belle Mead NJ* 2008;37:E163-166.

- [99] Shafer DM, Bay C, Caruso DM, Foster KN. The use of etidronate disodium in the prevention of heterotopic ossification in burn patients. *Burns J Int Soc Burn Inj* 2008;34:355–60. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.04.006>.
- [100] Teasell RW, Mehta S, Aubut JL, Ashe MC, Sequeira K, Macaluso S, et al. A systematic review of the therapeutic interventions for heterotopic ossification after spinal cord injury. *Spinal Cord* 2010;48:512–21. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.175>.
- [101] Spielman G, Gennarelli TA, Rogers CR. Disodium etidronate: its role in preventing heterotopic ossification in severe head injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1983;64:539–42.
- [102] Finerman GA, Stover SL. Heterotopic ossification following hip replacement or spinal cord injury. Two clinical studies with EHDP. *Metab Bone Dis Relat Res* 1981;3:337–42.
- [103] Hu HP, Kuijpers W, Slooff TJ, van Horn JR, Versleyen DH. The effect of biphosphonate on induced heterotopic bone. *Clin Orthop* 1991:259–67.
- [104] Hu HP, Slooff TJ, van Horn JR. Heterotopic ossification following total hip arthroplasty: a review. *Acta Orthop Belg* 1991;57:169–82.
- [105] Thomas BJ, Amstutz HC. Prevention of heterotopic bone formation: clinical experience with diphosphonates. *The Hip* 1987:59–69.
- [106] Denys P, Azouvi P, Denormandie P, Samuel C, Patel A, Bussel B. Late cognitive and behavioural improvement following treatment of disabling orthopaedic complications of a severe closed head injury. *Brain Inj* 1996;10:149–53.
- [107] Melamed E, Robinson D, Halperin N, Wallach N, Keren O, Groswasser Z. Brain injury-related heterotopic bone formation: treatment strategy and results. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81:670–4. <https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000023268.24759.36>.
- [108] Genêt F, Denormandie P, Keenan MA. Orthopaedic surgery for patients with central nervous system lesions: Concepts and techniques. *Ann Phys Rehabil Med* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2018.09.004>.
- [109] Meiners T, Abel R, Böhm V, Gerner HJ. Resection of heterotopic ossification of the hip in spinal cord injured patients. *Spinal Cord* 1997;35:443–5.
- [110] Moore KD, Goss K, Anglen JO. Indomethacin versus radiation therapy for prophylaxis against heterotopic ossification in acetabular fractures: a randomised, prospective study. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:259–63.
- [111] Sewick A, Makani A, Wu C, O'Donnell J, Baldwin KD, Lee G-C. Does dual antibiotic prophylaxis better prevent surgical site infections in total joint arthroplasty? *Clin Orthop* 2012;470:2702–7. <https://doi.org/10.1007/s11999-012-2255-1>.
- [112] Gatin L, Genêt F, Dinh A, Denormandie P. Postoperative infections after excision of neurogenic heterotopic ossifications at the hip: Risk factors and causative organisms. *Orthop Traumatol Surg Res OTSR* 2017;103:357–61. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2017.02.001>.
- [113] Garland DE, Hanscom DA, Keenan MA, Smith C, Moore T. Resection of heterotopic ossification in the adult with head trauma. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67:1261–9.
- [114] Potter BK, Burns TC, Lacap AP, Granville RR, Gajewski DA. Heterotopic ossification following traumatic and combat-related amputations. Prevalence, risk factors, and preliminary results of excision. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:476–86. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00412>.
- [115] Pavey GJ, Polfer EM, Nappo KE, Tintle SM, Forsberg JA, Potter BK. What Risk Factors Predict Recurrence of Heterotopic Ossification After Excision in Combat-related Amputations? *Clin Orthop* 2015;473:2814–24. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4266-1>.
- [116] Almangour W, Schnitzler A, Salga M, Debaud C, Denormandie P, Genêt F. Recurrence of heterotopic ossification after removal in patients with traumatic brain injury: A systematic review. *Ann Phys Rehabil Med* 2016;59:263–9. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2016.03.009>.
- [117] Genêt F, Chehensse C, Jourdan C, Lautridou C, Denormandie P, Schnitzler A. Impact of the operative delay and the degree of neurologic sequelae on recurrence of excised heterotopic

- ossification in patients with traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 2012;27:443–8. <https://doi.org/10.1097/HTR.0b013e31822b54ba>.
- [118] Genêt F, Jourdan C, Lautridou C, Chehensse C, Minooe K, Denormandie P, et al. The Impact of Preoperative Hip Heterotopic Ossification Extent on Recurrence in Patients with Head and Spinal Cord Injury: A Case Control Study. *PLoS ONE* 2011;6:e23129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023129>.
- [119] Genêt F, Ruet A, Almangour W, Gatin L, Denormandie P, Schnitzler A. Beliefs relating to recurrence of heterotopic ossification following excision in patients with spinal cord injury: a review. *Spinal Cord* 2015;53:340–4. <https://doi.org/10.1038/sc.2015.20>.
- [120] Kurz AZ, LeRoux E, Riediger M, Coughlin R, Simunovic N, Duong A, et al. Heterotopic Ossification in Hip Arthroscopy: an Updated Review. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2019;12:147–55. <https://doi.org/10.1007/s12178-019-09543-9>.
- [121] Elhassan Y, Abdelhaq A, Piggott RP, Osman M, McElwain JP, Leonard M. Heterotopic Ossification following acetabular fixation: Incidence and risk factors: 10-year experience of a tertiary centre. *Injury* 2016;47:1332–6. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2016.03.002>.
- [122] Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley LH. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *J Bone Joint Surg Am* 1973;55:1629–32.
- [123] Della Valle AG, Ruzo PS, Pavone V, Tolo E, Mintz DN, Salvati EA. Heterotopic ossification after total hip arthroplasty: a critical analysis of the Brooker classification and proposal of a simplified rating system. *J Arthroplasty* 2002;17:870–5.
- [124] Wright JG, Moran E, Bogoch E. Reliability and validity of the grading of heterotopic ossification. *J Arthroplasty* 1994;9:549–53.
- [125] Kanakaris NK, Giannoudis PV. Hip Heterotopic Ossification. In: Lasanianos NG, Kanakaris NK, Giannoudis PV, editors. *Trauma Orthop. Classif.*, London: Springer London; 2015, p. 425–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6572-9_98.
- [126] Macfarlane RJ, Ng BH, Gamie Z, El Masry MA, Velonis S, Schizas C, et al. Pharmacological treatment of heterotopic ossification following hip and acetabular surgery. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9:767–86. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.5.767>.
- [127] Firoozabadi R, Alton T, Sagi HC. Heterotopic Ossification in Acetabular Fracture Surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 2017;25:117–24. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-15-00366>.
- [128] Firoozabadi R, O'Mara TJ, Swenson A, Agel J, Beck JD, Routt M. Risk factors for the development of heterotopic ossification after acetabular fracture fixation. *Clin Orthop* 2014;472:3383–8. <https://doi.org/10.1007/s11999-014-3719-2>.
- [129] Guo JJ, Tang N, Yang HL, Qin L, Leung KS. Impact of surgical approach on postoperative heterotopic ossification and avascular necrosis in femoral head fractures: a systematic review. *Int Orthop* 2010;34:319–22. <https://doi.org/10.1007/s00264-009-0849-3>.
- [130] d'Heurle A, Archdeacon MT, Hiratzka S, Casstevens C, Finnan R, McCoy B. Do Surrogates of Injury Severity Influence the Occurrence of Heterotopic Ossification in Fractures of the Acetabulum? *J Orthop Trauma* 2016;30:213–6. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000000490>.
- [131] Johnson JT. Atypical myositis ossificans. *J Bone Joint Surg Am* 1957;39-A:189–93.
- [132] Schneider JC, Simko LC, Goldstein R, Shie VL, Chernack B, Levi B, et al. Predicting Heterotopic Ossification Early After Burn Injuries: A Risk Scoring System. *Ann Surg* 2017;266:179–84. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001841>.
- [133] Orchard GR, Paratz JD, Blot S, Roberts JA. Risk Factors in Hospitalized Patients With Burn Injuries for Developing Heterotopic Ossification--A Retrospective Analysis. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc* 2015;36:465–70. <https://doi.org/10.1097/BCR.0000000000000123>.
- [134] Thefenne L, de Brier G, Leclerc T, Jourdan C, Nicolas C, Truffaut S, et al. Two new risk factors for heterotopic ossification development after severe burns. *PloS One* 2017;12:e0182303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182303>.
- [135] Daniels CM, Pavey GJ, Arthur J, Noller M, Forsberg JA, Potter BK. Has the Proportion of

Combat-Related Amputations That Develop Heterotopic Ossification Increased? *J Orthop Trauma* 2018;32:283–7. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001158>.

- [136] Alfieri KA, Forsberg JA, Potter BK. Blast injuries and heterotopic ossification. *Bone Jt Res* 2012;1:192–7. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.18.2000102>.
- [137] Brown KV, Dharm-Datta S, Potter BK, Etherington J, Mistlin A, Hsu JR, et al. Comparison of development of heterotopic ossification in injured US and UK Armed Services personnel with combat-related amputations: preliminary findings and hypotheses regarding causality. *J Trauma* 2010;69 Suppl 1:S116-122. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181e44cc7>.
- [138] Potter BK, Burns TC, Lacap AP, Granville RR, Gajewski D. Heterotopic ossification in the residual limbs of traumatic and combat-related amputees. *J Am Acad Orthop Surg* 2006;14:S191-197.
- [139] Pavey GJ, Formby PM, Hoyt BW, Wagner SC, Forsberg JA, Potter BK. Intrawound Antibiotic Powder Decreases Frequency of Deep Infection and Severity of Heterotopic Ossification in Combat Lower Extremity Amputations. *Clin Orthop* 2019;477:802–10. <https://doi.org/10.1007/s11999.0000000000000090>.
- [140] Reznik JE, Biros E, Marshall R, Jelbart M, Milanese S, Gordon S, et al. Prevalence and risk-factors of neurogenic heterotopic ossification in traumatic spinal cord and traumatic brain injured patients admitted to specialised units in Australia. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2014;14:19–28.
- [141] Hendricks HT, Geurts ACH, van Ginneken BC, Heeren AJ, Vos PE. Brain injury severity and autonomic dysregulation accurately predict heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *Clin Rehabil* 2007;21:545–53. <https://doi.org/10.1177/0269215507075260>.
- [142] Zhang X, Jie S, Liu T, Zhang X. Acquired heterotopic ossification in hips and knees following encephalitis: case report and literature review. *BMC Surg* 2014;14:74. <https://doi.org/10.1186/1471-2482-14-74>.
- [143] Hernandez AM, Forner JV, de la Fuente T, Gonzalez C, Miro R. The para-articular ossifications in our paraplegics and tetraplegics: a survey of 704 patients. *Paraplegia* 1978;16:272–5. <https://doi.org/10.1038/sc.1978.52>.
- [144] Scher AT. The incidence of ectopic bone formation in post-traumatic paraplegic patients of different racial groups. *Paraplegia* 1976;14:202–6. <https://doi.org/10.1038/sc.1976.35>.
- [145] Citak M, Suero EM, Backhaus M, Aach M, Godry H, Meindl R, et al. Risk factors for heterotopic ossification in patients with spinal cord injury: a case-control study of 264 patients. *Spine* 2012;37:1953–7. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31825ee81b>.
- [146] Aito S, Gruppo Italiano Studio Epidemiologico Mielolesioni GISEM Group. Complications during the acute phase of traumatic spinal cord lesions. *Spinal Cord* 2003;41:629–35. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101513>.
- [147] Silver JR. Heterotopic ossification. A clinical study of its possible relationship to trauma. *Paraplegia* 1969;7:220–30. <https://doi.org/10.1038/sc.1969.37>.
- [148] Lal S, Hamilton BB, Heinemann A, Betts HB. Risk factors for heterotopic ossification in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1989;70:387–90.
- [149] Suero EM, Meindl R, Schildhauer TA, Citak M. Clinical Prediction Rule for Heterotopic Ossification of the Hip in Patients with Spinal Cord Injury. *Spine* 2018;43:1572–8. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002680>.
- [150] van Kampen PJ, Martina JD, Vos PE, Hoedemaekers CWE, Hendricks HT. Potential risk factors for developing heterotopic ossification in patients with severe traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 2011;26:384–91. <https://doi.org/10.1097/HTR.0b013e3181f78a59>.
- [151] Flin C, Curalucci H, Duvocelle A, Viton JM. [Heterotopic ossification and brain injury]. *Ann Readaptation Med Phys Rev Sci Soc Francaise Reeducation Fonct Readaptation Med Phys* 2002;45:517–20.
- [152] Dizdar D, Tiftik T, Kara M, Tunç H, Ersöz M, Akkuş S. Risk factors for developing heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *Brain Inj* 2013;27:807–11.

<https://doi.org/10.3109/02699052.2013.775490>.

- [153] Hurvitz EA, Mandac BR, Davidoff G, Johnson JH, Nelson VS. Risk factors for heterotopic ossification in children and adolescents with severe traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1992;73:459–62.
- [154] Seignalet J, Moulin M, Pelissier J, Romain M, Bouffead-Vercelli M, Lapinski H, et al. HLA and neurogenic paraosteopathies. *Tissue Antigens* 1983;21:268–9.
- [155] Owens BD, Kragh JF, Wenke JC, Macaitis J, Wade CE, Holcomb JB. Combat wounds in operation Iraqi Freedom and operation Enduring Freedom. *J Trauma* 2008;64:295–9. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318163b875>.
- [156] Isaacson BM, Potter BK, Bloebaum RD, Epperson RT, Kawaguchi BS, Swanson TM, et al. Link Between Clinical Predictors of Heterotopic Ossification and Histological Analysis in Combat-Injured Service Members. *J Bone Joint Surg Am* 2016;98:647–57. <https://doi.org/10.2106/JBJS.15.00895>.
- [157] Pape HC, Lehmann U, van Griensven M, Gänsslen A, von Glinski S, Krettek C. Heterotopic ossifications in patients after severe blunt trauma with and without head trauma: incidence and patterns of distribution. *J Orthop Trauma* 2001;15:229–37.
- [158] Edwards DS, Clasper JC. Heterotopic ossification: a systematic review. *J R Army Med Corps* 2015;161:315–21. <https://doi.org/10.1136/jramc-2014-000277>.
- [159] Jacobs JW, De Sonnaville PB, Hulsmans HM, van Rinsum AC, Bijlsma JW. Polyarticular heterotopic ossification complicating critical illness. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:1145–9.
- [160] Vaishya R, Agarwal AK, Vijay V, Vaish A. Heterotopic Ossification Circumferentia Articularis (HOCA) of Both Knee Joints After Guillain-Barré Syndrome. *Cureus* 2016;8:e480. <https://doi.org/10.7759/cureus.480>.
- [161] Goodman TA, Merkel PA, Perlmutter G, Doyle MK, Krane SM, Polisson RP. Heterotopic ossification in the setting of neuromuscular blockade. *Arthritis Rheum* 1997;40:1619–27. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199709\)40:9<1619::AID-ART11>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199709)40:9<1619::AID-ART11>3.0.CO;2-M).
- [162] Zeilig G, Weingarden HP, Levy R, Peer I, Ohry A, Blumen N. Heterotopic ossification in Guillain-Barré syndrome: incidence and effects on functional outcome with long-term follow-up. *Arch Phys Med Rehabil* 2006;87:92–5. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2005.07.308>.
- [163] Gibson CJ, Poduri KR. Heterotopic ossification as a complication of toxic epidermal necrolysis. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78:774–6.
- [164] Garland DE. Clinical observations on fractures and heterotopic ossification in the spinal cord and traumatic brain injured populations. *Clin Orthop* 1988;86–101.
- [165] Garland DE, Keenan MA. Orthopedic strategies in the management of the adult head-injured patient. *Phys Ther* 1983;63:2004–9.
- [166] Kushwaha VP, Garland DG. Extremity fractures in the patient with a traumatic brain injury. *J Am Acad Orthop Surg* 1998;6:298–307.
- [167] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644–55. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>.
- [168] Varela ML, Mogildea M, Moreno I, Lopes A. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* 2018;41:1115–27. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>.
- [169] Raith EP, Udy AA, Bailey M, McGloughlin S, MacIsaac C, Bellomo R, et al. Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *JAMA* 2017;317:290–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.20328>.
- [170] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819–26. <https://doi.org/10.1038/nature06246>.
- [171] Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853–9. <https://doi.org/10.1038/nature01321>.

- [172] Pierce A, Pittet J-F. Inflammatory response to trauma: implications for coagulation and resuscitation. *Curr Opin Anaesthesiol* 2014;27:246–52. <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000047>.
- [173] Ward PA, Lentsch AB. The acute inflammatory response and its regulation. *Arch Surg Chic Ill* 1960 1999;134:666–9. <https://doi.org/10.1001/archsurg.134.6.666>.
- [174] Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L, Valdez-Hernández L, Meza-Sosa KF, Ando-Kuri M. Negative regulation of the inflammasome: keeping inflammation under control. *Immunol Rev* 2015;265:231–57. <https://doi.org/10.1111/imr.12294>.
- [175] Lu J, Goh SJ, Tng PYL, Deng YY, Ling E-A, Moochhala S. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci Landmark Ed* 2009;14:3795–813.
- [176] Huang H, Cheng W-X, Hu Y-P, Chen J-H, Zheng Z-T, Zhang P. Relationship between heterotopic ossification and traumatic brain injury: Why severe traumatic brain injury increases the risk of heterotopic ossification. *J Orthop Transl* 2018;12:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.10.002>.
- [177] Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Dev Camb Engl* 2012;139:2845–56. <https://doi.org/10.1242/dev.069088>.
- [178] Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes M-C, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol* 2015;5:1027–59. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140068>.
- [179] Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010;12:143–52. <https://doi.org/10.1038/ncb2014>.
- [180] Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep* 2013;14:1062–72. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.182>.
- [181] Dufresne SS, Frenette J, Dumont NA. Inflammation et régénération musculaire: Une arme à double tranchant. *Médecine/Sciences* 2016;32:591–7. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163206022>.
- [182] Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>.
- [183] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013;14:986–95. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>.
- [184] Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum* 2010;62:268–79. <https://doi.org/10.1002/art.27183>.
- [185] Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10:427–39. <https://doi.org/10.1038/nri2779>.
- [186] Orimo H, de Souza AC, Ouchi Y, Nakamura T, Shiraki M. Skeletal tissue and nutrition in the aging process: an overview. *Nutr Rev* 1992;50:382–4. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1992.tb02486.x>.
- [187] Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1993;265:R166–172. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.1.R166>.
- [188] Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000;177:195–203.
- [189] Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev* 2009;37:18–22. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318190ebdb>.
- [190] Duchesne E, Bouchard P, Roussel M-P, Côté CH. Mast cells can regulate skeletal muscle cell proliferation by multiple mechanisms. *Muscle Nerve* 2013;48:403–14. <https://doi.org/10.1002/mus.23758>.
- [191] Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to

- support myogenesis. *J Exp Med* 2007;204:1057–69. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>.
- [192] Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, et al. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 2002;23:189–94. <https://doi.org/10.1007/s100720200060>.
- [193] Sonnet C, Lafuste P, Arnold L, Brigitte M, Poron F, Authier F-J, et al. Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J Cell Sci* 2006;119:2497–507. <https://doi.org/10.1242/jcs.02988>.
- [194] Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells Dayt Ohio* 2013;31:384–96. <https://doi.org/10.1002/stem.1288>.
- [195] Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 2013;153:376–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.053>.
- [196] Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6:135–42. <https://doi.org/10.1038/ni1158>.
- [197] Duchesne E, Tremblay M-H, Côté CH. Mast cell tryptase stimulates myoblast proliferation; a mechanism relying on protease-activated receptor-2 and cyclooxygenase-2. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;12:235. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-12-235>.
- [198] Pannérec A, Marazzi G, Sassoon D. Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche. *Trends Mol Med* 2012;18:599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.07.004>.
- [199] Mounier R, Chrétien F, Chazaud B. Blood vessels and the satellite cell niche. *Curr Top Dev Biol* 2011;96:121–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00005-X>.
- [200] Macé B. Histologie - Bases fondamentales. *Histol. - Bases Fondam.*, Omniscience; 2008.
- [201] Eap S. Développement d'implants nanofibreux actifs pour la régénération osseuse. *Biomatériaux*. Université de Strasbourg, 2014.
- [202] Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:341–2. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.015>.
- [203] Sagorny K, Chapellier M, Laperrousaz B, Maguer-Satta V. [BMP and cancer: the Yin and Yang of stem cells]. *Med Sci MS* 2012;28:416–22. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012284020>.
- [204] Chen J, Van Gulden S, McGuire TL, Fleming AC, Oka C, Kessler JA, et al. BMP-Responsive Protease HtrA1 Is Differentially Expressed in Astrocytes and Regulates Astrocytic Development and Injury Response. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2018;38:3840–57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2031-17.2018>.
- [205] Bleuming SA, He XC, Kodach LL, Hardwick JC, Koopman FA, Ten Kate FJ, et al. Bone morphogenetic protein signaling suppresses tumorigenesis at gastric epithelial transition zones in mice. *Cancer Res* 2007;67:8149–55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4659>.
- [206] Kodach LL, Wiercinska E, de Miranda NFCC, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP, et al. The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology* 2008;134:1332–41. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.059>.
- [207] Ong KL, Villarraga ML, Lau E, Carreon LY, Kurtz SM, Glassman SD. Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data. *Spine* 2010;35:1794–800. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181ecf6e4>.
- [208] Moghadam HG, Urist MR, Sandor GK, Clokie CM. Successful mandibular reconstruction using a BMP bioimplant. *J Craniofac Surg* 2001;12:119–27; discussion 128.
- [209] Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1301–5.
- [210] Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone*

- Miner Res 1989;4:783–8. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650040519>.
- [211] Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption. An update. *Acta Orthop Scand Suppl* 1995;266:66–70.
- [212] Chang MK, Raggatt L-J, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008;181:1232–44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1232>.
- [213] Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt L-J. Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Bone* 2008;43:976–82. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.128>.
- [214] Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 2010;116:4815–28. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-253534>.
- [215] Depalle B. Influence de l'hétérogénéité des propriétés mécaniques sur la résistance de l'os trabéculaire humain. *Sciences agricoles. INSA de Lyon*, 2011.
- [216] Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 2004;14:86–93. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.12.003>.
- [217] Kurer MH, Khoker MA, Dandona P. Human osteoblast stimulation by sera from paraplegic patients with heterotopic ossification. *Paraplegia* 1992;30:165–8. <https://doi.org/10.1038/sc.1992.58>.
- [218] Kang H, Dang ABC, Joshi SK, Halloran B, Nissenson R, Zhang X, et al. Novel mouse model of spinal cord injury-induced heterotopic ossification. *J Rehabil Res Dev* 2014;51:1109–18. <https://doi.org/10.1682/JRRD.2014.01.0019>.
- [219] Bradbury EJ, Moon LDF, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002;416:636–40. <https://doi.org/10.1038/416636a>.
- [220] Engstrand T, Veltheim R, Arnander C, Docherty-Skog A-C, Westermarck A, Ohlsson C, et al. A novel biodegradable delivery system for bone morphogenetic protein-2. *Plast Reconstr Surg* 2008;121:1920–8. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31817151b0>.
- [221] Genêt F, Kulina I, Vaquette C, Torossian F, Millard S, Pettit AR, et al. Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by macrophage-mediated inflammation in muscle. *J Pathol* 2015;236:229–40. <https://doi.org/10.1002/path.4519>.
- [222] Hodges SJ, Agbaji AS, Harvey AL, Hider RC. Cobra cardiotoxins. Purification, effects on skeletal muscle and structure/activity relationships [published erratum appears in *Eur J Biochem* 1988 Feb 1;171(3):727]. *Eur J Biochem* 1987;165:373–83. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11450.x>.
- [223] Shi W-Z, Ju J-Y, Xiao H-J, Xue F, Wu J, Pan M-M, et al. Dynamics of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1 in a rat model of brain injury combined with traumatic heterotopic ossification. *Mol Med Rep* 2017;15:2129–35. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6275>.
- [224] Kulina I. Understanding heterotopic ossification after spinal cord injury. University of Queensland, 2015.
- [225] Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:762. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>.
- [226] Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:775. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0289>.
- [227] Newsholme EA, Parry-Billings M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1990;14:63S-67S. <https://doi.org/10.1177/014860719001400406>.
- [228] Vary TC, Kimball SR. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and

- sepsis. *Am J Physiol* 1992;262:C445-452. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.2.C445>.
- [229] Langhans C, Weber-Carstens S, Schmidt F, Hamati J, Kny M, Zhu X, et al. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. *PloS One* 2014;9:e92048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092048>.
- [230] Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-Schroeder A, et al. Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness. *Intensive Care Med* 2014;40:528–38. <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3224-9>.
- [231] Rocheteau P, Chatre L, Briand D, Mebarki M, Jouvion G, Bardon J, et al. Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat Commun* 2015;6:10145. <https://doi.org/10.1038/ncomms10145>.
- [232] Herridge MS, Tansey CM, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2011;364:1293–304. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011802>.
- [233] Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 2010;304:1787–94. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1553>.
- [234] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893–9. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.893>.
- [235] Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* 2014;1:87–105. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.07.005>.
- [236] Wang H, Lindborg C, Lounev V, Kim J-H, McCarrick-Walmsley R, Xu M, et al. Cellular Hypoxia Promotes Heterotopic Ossification by Amplifying BMP Signaling. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2016;31:1652–65. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2848>.
- [237] Agarwal S, Loder S, Brownley C, Cholok D, Mangiavini L, Li J, et al. Inhibition of Hif1 α prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E338-347. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515397113>.
- [238] Wan C, Shao J, Gilbert SR, Riddle RC, Long F, Johnson RS, et al. Role of HIF-1 α in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1192:322–6. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05238.x>.
- [239] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677–84. <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>.
- [240] Lin J-A, Liao C-C, Chang C-C, Chang H, Chen T-L. Postoperative adverse outcomes in intellectually disabled surgical patients: a nationwide population-based study. *PloS One* 2011;6:e26977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026977>.
- [241] Zimmermann SM, Würgler-Hauri CC, Wanner GA, Simmen HP, Werner CML. Echinomycin in the prevention of heterotopic ossification - an experimental antibiotic agent shows promising results in a murine model. *Injury* 2013;44:570–5. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.12.030>.
- [242] Green AC, Kocovski P, Jovic T, Walia MK, Chandraratna R a. S, Martin TJ, et al. Retinoic acid receptor signalling directly regulates osteoblast and adipocyte differentiation from mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 2017;350:284–97. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.12.007>.
- [243] Underhill TM, Weston AD. Retinoids and their receptors in skeletal development. *Microsc Res Tech* 1998;43:137–55. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981015\)43:2<137::AID-JEMT7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981015)43:2<137::AID-JEMT7>3.0.CO;2-3).
- [244] Sinha S, Uchibe K, Usami Y, Pacifici M, Iwamoto M. Effectiveness and mode of action of a combination therapy for heterotopic ossification with a retinoid agonist and an anti-inflammatory agent. *Bone* 2016;90:59–68. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.008>.
- [245] Pavey GJ, Qureshi AT, Tomasino AM, Honnold CL, Bishop DK, Agarwal S, et al. Targeted stimulation of retinoic acid receptor- γ mitigates the formation of heterotopic ossification in an

- established blast-related traumatic injury model. *Bone* 2016;90:159–67. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.014>.
- [246] Shimono K, Morrison TN, Tung W, Chandraratna RA, Williams JA, Iwamoto M, et al. Inhibition of ectopic bone formation by a selective retinoic acid receptor alpha-agonist: a new therapy for heterotopic ossification? *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2010;28:271–7. <https://doi.org/10.1002/jor.20985>.
- [247] Shimono K, Tung W-E, Macolino C, Chi AH-T, Didizian JH, Mundy C, et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor- γ agonists. *Nat Med* 2011;17:454–60. <https://doi.org/10.1038/nm.2334>.
- [248] Salisbury E, Rodenberg E, Sonnet C, Hipp J, Gannon FH, Vadakkan TJ, et al. Sensory nerve induced inflammation contributes to heterotopic ossification. *J Cell Biochem* 2011;112:2748–58. <https://doi.org/10.1002/jcb.23225>.
- [249] Debaud C, Salga M, Begot L, Holy X, Chedik M, de l’Escalopier N, et al. Peripheral denervation participates in heterotopic ossification in a spinal cord injury model. *PloS One* 2017;12:e0182454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182454>.
- [250] Ma CHE, Brenner GJ, Omura T, Samad OA, Costigan M, Inquimbert P, et al. The BMP coreceptor RGMb promotes while the endogenous BMP antagonist noggin reduces neurite outgrowth and peripheral nerve regeneration by modulating BMP signaling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2011;31:18391–400. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4550-11.2011>.
- [251] Gugala Z, Olmsted-Davis EA, Xiong Y, Davis EL, Davis AR. Trauma-Induced Heterotopic Ossification Regulates the Blood-Nerve Barrier. *Front Neurol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00408>.
- [252] Nash MS. Known and plausible modulators of depressed immune functions following spinal cord injuries. *J Spinal Cord Med* 2000;23:111–20.
- [253] Komori T. Glucocorticoid Signaling and Bone Biology. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* 2016;48:755–63. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110571>.
- [254] Kelestimir F. Growth hormone deficiency after traumatic brain injury in adults: when to test and how to treat? *Pediatr Endocrinol Rev PER* 2009;6 Suppl 4:534–9.
- [255] Aimaretti G, Ambrosio MR, Di Somma C, Fusco A, Cannavò S, Gasperi M, et al. Traumatic brain injury and subarachnoid haemorrhage are conditions at high risk for hypopituitarism: screening study at 3 months after the brain injury. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:320–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02094.x>.
- [256] Campagnolo DI, Bartlett JA, Chatterton R, Keller SE. Adrenal and pituitary hormone patterns after spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil* 1999;78:361–6.
- [257] Lucin KM, Sanders VM, Jones TB, Malarkey WB, Popovich PG. Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation. *Exp Neurol* 2007;207:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.05.019>.
- [258] Marusić A, Raisz LG. Cortisol modulates the actions of interleukin-1 alpha on bone formation, resorption, and prostaglandin production in cultured mouse parietal bones. *Endocrinology* 1991;129:2699–706. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2699>.
- [259] Bidner SM, Rubins IM, Desjardins JV, Zukor DJ, Goltzman D. Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72:1144–9.
- [260] Cadosch D, Toffoli AM, Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R, Skirving AP, et al. Serum after traumatic brain injury increases proliferation and supports expression of osteoblast markers in muscle cells. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:645–53. <https://doi.org/10.2106/JBJS.I.00097>.
- [261] Gautschi OP, Toffoli AM, Joesbury KA, Skirving AP, Filgueira L, Zellweger R. Osteoinductive effect of cerebrospinal fluid from brain-injured patients. *J Neurotrauma* 2007;24:154–62. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.0166>.
- [262] Sims NA, Quinn JMW. Osteoimmunology: oncostatin M as a pleiotropic regulator of bone formation and resorption in health and disease. *BoneKEY Rep* 2014;3:527. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.22>.

- [263] Guihard P, Boutet M-A, Brounais-Le Royer B, Gamblin A-L, Amiaud J, Renaud A, et al. Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury. *Am J Pathol* 2015;185:765–75. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.008>.
- [264] Alexander KA, Tseng H-W, Fleming W, Jose B, Salga M, Kulina I, et al. Inhibition of JAK1/2 Tyrosine Kinases Reduces Neurogenic Heterotopic Ossification After Spinal Cord Injury. *Front Immunol* 2019;10:377. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00377>.
- [265] Al-Ali HK, Griesshammer M, le Coutre P, Waller CF, Liberati AM, Schafhausen P, et al. Safety and efficacy of ruxolitinib in an open-label, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial. *Haematologica* 2016;101:1065–73. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.143677>.
- [266] Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, Ishihara H, Kajiwara K, Kato S, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma* 2004;21:1706–11. <https://doi.org/10.1089/neu.2004.21.1706>.
- [267] Jia F, Pan Y, Mao Q, Liang Y, Jiang J. Matrix metalloproteinase-9 expression and protein levels after fluid percussion injury in rats: the effect of injury severity and brain temperature. *J Neurotrauma* 2010;27:1059–68. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.1067>.
- [268] Lee JY, Kim HS, Choi HY, Oh TH, Yune TY. Fluoxetine inhibits matrix metalloprotease activation and prevents disruption of blood-spinal cord barrier after spinal cord injury. *Brain J Neurol* 2012;135:2375–89. <https://doi.org/10.1093/brain/aws171>.
- [269] Hadass O, Tomlinson BN, Gooyit M, Chen S, Purdy JJ, Walker JM, et al. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-9 attenuates secondary damage resulting from severe traumatic brain injury. *PloS One* 2013;8:e76904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076904>.
- [270] Rodenberg E, Azhdarinia A, Lazard ZW, Hall M, Kwon SK, Wilganowski N, et al. Matrix metalloproteinase-9 is a diagnostic marker of heterotopic ossification in a murine model. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2487–96. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0007>.
- [271] Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14:2123–33. <https://doi.org/10.1101/gad.815400>.
- [272] Evans KN, Forsberg JA, Potter BK, Hawksworth JS, Brown TS, Andersen R, et al. Inflammatory cytokine and chemokine expression is associated with heterotopic ossification in high-energy penetrating war injuries. *J Orthop Trauma* 2012;26:e204-213. <https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e31825d60a5>.
- [273] Forsberg JA, Potter BK, Polfer EM, Safford SD, Elster EA. Do inflammatory markers portend heterotopic ossification and wound failure in combat wounds? *Clin Orthop* 2014;472:2845–54. <https://doi.org/10.1007/s11999-014-3694-7>.
- [274] Sims NA. Cell-specific paracrine actions of IL-6 family cytokines from bone, marrow and muscle that control bone formation and resorption. *Int J Biochem Cell Biol* 2016;79:14–23. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.08.003>.
- [275] Dresner-Pollak R, Gelb N, Rachmilewitz D, Karmeli F, Weinreb M. Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology* 2004;127:792–801. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.06.013>.
- [276] Tamasi JA, Vasilov A, Shimizu E, Benton N, Johnson J, Bitel CL, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of the anabolic action of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2013;28:1975–86. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1933>.
- [277] Kan L, Lounev VY, Pignolo RJ, Duan L, Liu Y, Stock SR, et al. Substance P signaling mediates BMP-dependent heterotopic ossification. *J Cell Biochem* 2011;112:2759–72. <https://doi.org/10.1002/jcb.23259>.
- [278] Levesque J-P, Sims NA, Pettit AR, Alexander KA, Tseng H-W, Torossian F, et al. **Macrophages** Driving Heterotopic Ossification: Convergence of Genetically-Driven and Trauma-Driven Mechanisms: LETTER TO THE EDITOR. *J Bone Miner Res* 2018;33:365–6.

<https://doi.org/10.1002/jbmr.3346>.

- [279] Lees-Shepard JB, Goldhamer DJ. Stem cells and heterotopic ossification: Lessons from animal models. *Bone* 2018;109:178–86. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.01.029>.
- [280] Hashimoto N, Kiyono T, Wada MR, Umeda R, Goto Y, Nonaka I, et al. Osteogenic properties of human myogenic progenitor cells. *Mech Dev* 2008;125:257–69. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.11.004>.
- [281] Lounev VY, Ramachandran R, Wosczyzna MN, Yamamoto M, Maidment AD, Shore EM, et al. Identification of Progenitor Cells That Contribute to Heterotopic Skeletogenesis: *J Bone Jt Surg-Am Vol* 2009;91:652–63. <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.01177>.
- [282] Wosczyzna MN, Biswas AA, Cogswell CA, Goldhamer DJ. Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2012;27:1004–17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1562>.
- [283] Matthews BG, Torreggiani E, Roeder E, Matic I, Grcevic D, Kalajzic I. Osteogenic potential of alpha smooth muscle actin expressing muscle resident progenitor cells. *Bone* 2016;84:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.12.010>.
- [284] Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, et al. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7251–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000302107>.
- [285] Friedenstein 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.
- [286] Farrell E, Both SK, Odörfer KI, Koevoet W, Kops N, O'Brien FJ, et al. In-vivo generation of bone via endochondral ossification by in-vitro chondrogenic priming of adult human and rat mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;12:31. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-12-31>.
- [287] Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001;32:1005–11. <https://doi.org/10.1161/01.str.32.4.1005>.
- [288] Brazelton TR, Nystrom M, Blau HM. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Dev Biol* 2003;262:64–74. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00357-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00357-9).
- [289] Davies OG, Grover LM, Eisenstein N, Lewis MP, Liu Y. Identifying the Cellular Mechanisms Leading to Heterotopic Ossification. *Calcif Tissue Int* 2015;97:432–44. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0034-1>.
- [290] Nesti LJ, Jackson WM, Shanti RM, Koehler SM, Aragon AB, Bailey JR, et al. Differentiation potential of multipotent progenitor cells derived from war-traumatized muscle tissue. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:2390–8. <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.00049>.
- [291] Jackson WM, Aragon AB, Bulken-Hoover JD, Nesti LJ, Tuan RS. Putative heterotopic ossification progenitor cells derived from traumatized muscle. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2009;27:1645–51. <https://doi.org/10.1002/jor.20924>.
- [292] Joe AWB, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010;12:153–63. <https://doi.org/10.1038/ncb2015>.
- [293] Hejbøl EK, Hajjaj MA, Nielsen O, Schrøder HD. Marker Expression of Interstitial Cells in Human Skeletal Muscle: An Immunohistochemical Study. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 2019;22155419871033. <https://doi.org/10.1369/0022155419871033>.
- [294] Biferali B, Proietti D, Mozzetta C, Madaro L. Fibro–Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. *Front Physiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01074>.
- [295] Lemos DR, Eisner C, Hopkins CI, Rossi FMV. Skeletal muscle-resident MSCs and bone formation. *Bone* 2015;80:19–23. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.06.013>.

- [296] Madaro L, Passafaro M, Sala D, Etxaniz U, Lugarini F, Proietti D, et al. Denervation-activated STAT3–IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat Cell Biol* 2018;20:917–27. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0151-y>.
- [297] Birbrair A, Zhang T, Wang Z-M, Messi ML, Mintz A, Delbono O. Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. *Front Aging Neurosci* 2014;6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00245>.
- [298] Kaplan FS, Tabas JA, Gannon FH, Finkel G, Hahn GV, Zasloff MA. The histopathology of fibrodysplasia ossificans progressiva. An endochondral process. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:220–30. <https://doi.org/10.2106/00004623-199302000-00009>.
- [299] Stoeger T, Proetzel GE, Welzel H, Papadimitriou A, Dony C, Balling R, et al. In situ gene expression analysis during BMP2-induced ectopic bone formation in mice shows simultaneous endochondral and intramembranous ossification. *Growth Factors Chur Switz* 2002;20:197–210.
- [300] Kieser KJ, Kagan JC. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2017;17:376–90. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.25>.
- [301] Peterson JR, Eboda ON, Brownley RC, Cilwa KE, Pratt LE, De La Rosa S, et al. Effects of aging on osteogenic response and heterotopic ossification following burn injury in mice. *Stem Cells Dev* 2015;24:205–13. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0291>.
- [302] Seavey JG, Wheatley BM, Pavey GJ, Tomasino AM, Hanson MA, Sanders EM, et al. Early local delivery of vancomycin suppresses ectopic bone formation in a rat model of trauma-induced heterotopic ossification. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2017;35:2397–406. <https://doi.org/10.1002/jor.23544>.
- [303] Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med* 2005;37:129–36. <https://doi.org/10.1080/16501970510027628>.
- [304] Rosin AJ. Ectopic calcification around joints of paralysed limbs in hemiplegia, diffuse brain damage, and other neurological diseases. *Ann Rheum Dis* 1975;34:499–505.
- [305] Aubut J-AL, Mehta S, Cullen N, Teasell RW, ERABI Group, Scire Research Team. A comparison of heterotopic ossification treatment within the traumatic brain and spinal cord injured population: An evidence based systematic review. *NeuroRehabilitation* 2011;28:151–60. <https://doi.org/10.3233/NRE-2011-0643>.
- [306] Salga M, Jourdan C, Durand M-C, Hangard C, Denormandie P, Carlier R-Y, et al. Sciatic nerve compression by neurogenic heterotopic ossification: use of CT to determine surgical indications. *Skeletal Radiol* 2015;44:233–40. <https://doi.org/10.1007/s00256-014-2003-6>.
- [307] Hassard GH. Heterotopic bone formation about the hip and unilateral decubitus ulcers in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1975;56:355–8.
- [308] Safaz I, Alaca R, Yasar E, Tok F, Yilmaz B. Medical complications, physical function and communication skills in patients with traumatic brain injury: a single centre 5-year experience. *Brain Inj* 2008;22:733–9. <https://doi.org/10.1080/02699050802304714>.
- [309] Genêt F, Jourdan C, Schnitzler A, Lautridou C, Guillemot D, Judet T, et al. Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PLoS One* 2011;6:e16632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016632>.
- [310] Kiresuk TJ, Sherman RE. Goal attainment scaling: A general method for evaluating comprehensive community mental health programs. *Community Ment Health J* 1968;4:443–53. <https://doi.org/10.1007/BF01530764>.
- [311] Krasny-Pacini A, Hiebel J, Pauly F, Godon S, Chevignard M. Goal attainment scaling in rehabilitation: a literature-based update. *Ann Phys Rehabil Med* 2013;56:212–30. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2013.02.002>.
- [312] Denormandie P, de l'Escalopier N, Gatin L, Grelier A, Genêt F. Resection of neurogenic heterotopic ossification (NHO) of the hip. *Orthop Traumatol Surg Res OTSR* 2018;104:S121–7. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2017.04.015>.
- [313] Almangour W, Schnitzler A, Salga M, Debaud C, Denormandie P, Genêt F. Recurrence of heterotopic ossification after removal in patients with traumatic brain injury: A systematic review. *Ann Phys Rehabil Med* 2016;59:263–9. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2016.03.009>.

- [314] Xu L, Zhang Y, Huang Y. Advances in the Treatment of Neuropathic Pain. *Adv Exp Med Biol* 2016;904:117–29. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7537-3_9.
- [315] Olafsen NP, Herring SA, Orchard JW. Injectable Corticosteroids in Sport. *Clin J Sport Med Off J Can Acad Sport Med* 2018;28:451–6. <https://doi.org/10.1097/JSM.0000000000000603>.
- [316] Poddar SK, Widstrom L. Nonoperative Options for Management of Articular Cartilage Disease. *Clin Sports Med* 2017;36:447–56. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.003>.
- [317] Filardo G, Kon E, Longo UG, Madry H, Marchettini P, Marmotti A, et al. Non-surgical treatments for the management of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA* 2016;24:1775–85. <https://doi.org/10.1007/s00167-016-4089-y>.
- [318] Denys P, Azouvi P, Denormandie P, Samuel C, Patel A, Bussel B. Late cognitive and behavioural improvement following treatment of disabling orthopaedic complications of a severe closed head injury. *Brain Inj* 1996;10:149–53.
- [319] Mahmood S, Al-Thani H, El-Menyar A, Alani M, Al-Hassani A, Mathrdikkal S, et al. Tramadol in traumatic brain injury: Should we continue to use it? *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2015;31:344–8. <https://doi.org/10.4103/0970-9185.161670>.
- [320] Brooke MM, Heard DL, de Lateur BJ, Moeller DA, Alquist AD. Heterotopic ossification and peripheral nerve entrapment: early diagnosis and excision. *Arch Phys Med Rehabil* 1991;72:425–9.
- [321] Hollander JL, Brown EM, Jessar RA, Brown CY. Hydrocortisone and cortisone injected into arthritic joints; comparative effects of and use of hydrocortisone as a local antiarthritic agent. *J Am Med Assoc* 1951;147:1629–35.
- [322] Althoff CE, Bollow M, Feist E, Marticorena-Garcia SR, Eshed I, Diekhoff T, et al. CT-guided corticosteroid injection of the sacroiliac joints: quality assurance and standardized prospective evaluation of long-term effectiveness over six months. *Clin Rheumatol* 2015;34:1079–84. <https://doi.org/10.1007/s10067-015-2937-7>.
- [323] McCabe PS, Maricar N, Parkes MJ, Felson DT, O'Neill TW. The efficacy of intra-articular steroids in hip osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24:1509–17. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.04.018>.
- [324] Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:775–86. <https://doi.org/10.1038/nrn1765>.
- [325] Salga M, Tseng H-W, Alexander KA, Jose B, Vaquette C, Debaud C, et al. Blocking neuromuscular junctions with botulinum toxin A injection enhances neurological heterotopic ossification development after spinal cord injury in mice. *Ann Phys Rehabil Med* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2019.01.005>.
- [326] Genêt F, Jourdan C, Lautridou C, Chehensse C, Minooee K, Denormandie P, et al. The impact of preoperative hip heterotopic ossification extent on recurrence in patients with head and spinal cord injury: a case control study. *PloS One* 2011;6:e23129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023129>.
- [327] Genêt F, Ruet A, Almangour W, Gatin L, Denormandie P, Schnitzler A. Beliefs relating to recurrence of heterotopic ossification following excision in patients with spinal cord injury: a review. *Spinal Cord* 2015;53:340–4. <https://doi.org/10.1038/sc.2015.20>.
- [328] Genêt F, Minooee K, Jourdan C, Ruet A, Denormandie P, Schnitzler A. Troublesome heterotopic ossification and stroke: Features and risk factors. A case control study. *Brain Inj* 2015;29:866–71. <https://doi.org/10.3109/02699052.2015.1005133>.
- [329] Wang Q, Zhang P, Li P, Song X, Hu H, Li X, et al. Ultrasonography Monitoring of Trauma-Induced Heterotopic Ossification: Guidance for Rehabilitation Procedures. *Front Neurol* 2018;9:771. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00771>.
- [330] Bressler EL, Marn CS, Gore RM, Hendrix RW. Evaluation of ectopic bone by CT. *AJR Am J Roentgenol* 1987;148:931–5. <https://doi.org/10.2214/ajr.148.5.931>.
- [331] Davis G, Patel RP, Tan TL, Alijanipour P, Naik TU, Parvizi J. Ethnic differences in heterotopic ossification following total hip arthroplasty. *Bone Jt J* 2016;98-B:761–6.

<https://doi.org/10.1302/0301-620X.98B6.36050>.

[332] Slone HS, Walton ZJ, Daly CA, Chapin RW, Barfield WR, Leddy LR, et al. The impact of race on the development of severe heterotopic ossification following acetabular fracture surgery. *Injury* 2015;46:1069–73. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.01.039>.

Titre : Inflammation et paraostéoarthropathies neurogènes

Mots clés : ostéome, ossification hétérotopiques, ossification hétérotopique neurogène, paraostéoarthropathies, paraostéoarthropathies neurogène, traumatisme crânien, blessé médullaire, accident vasculaire cérébral, inflammation, infection

Résumé : Les ossifications hétérotopiques (OH) sont des formations osseuses bénignes anormalement situées dans les tissus mous du corps humain. Les OH peuvent être d'origine génétique, acquise et idiopathique. Elles sont appelées paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) lorsqu'elles se développent après une lésion du système nerveux central. Cette thèse a pour objectif de préciser les facteurs inflammatoires locaux et systémiques, impliqués dans la survenue de POAN. Nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'injection de composants de paroi membranaire bactérienne dans un modèle de souris développant des ossifications hétérotopiques neurogènes (OHN) après section médullaire et injection intramusculaire d'un myotoxique chimique. L'injection locale intramusculaire comme systémique d'un composant de paroi d'*Escherichia Coli* ou de *Staphylococcus Aureus* a permis d'augmenter de façon significative le volume des OHN. A l'issue de ces expériences, il semble que le niveau d'inflammation intramusculaire influence de façon importante le volume des OHN, selon un effet-dose. La provenance des agents de paroi bactérienne fait supposer que l'inflammation pourrait être spécifiquement induite par des pathogènes infectieux. Il semblerait qu'il existe un niveau inflammatoire seuil à partir duquel, la section médullaire ne soit plus obligatoire à la survenue d'OH. Toujours dans le même modèle murin, nous avons montré que le blocage de la jonction neuro-musculaire par une injection de toxine botulique augmente le volume des OHN. La jonction neuro-musculaire semble réguler le développement de OHN dans un muscle pathologique chez la souris avec section médullaire. Il est possible que cette régulation s'effectue via un mécanisme de neuro-inflammation locale. Suite à ces découvertes en recherche fondamentale, nous avons mené une étude cas-témoins recherchant des facteurs pourvoyeurs d'inflammation à la phase très précoce suivant l'accident neurologique, qui

pourraient être corrélés à l'apparition de POAN. Cette étude a été la première à montrer que les patients avec POAN présentent de façon plus importante des infections à *Pseudomonas Aeruginosa*. La présence de traumatismes associés et de chirurgies était corrélée à la survenue de POAN, tout comme la longueur de la ventilation mécanique, du coma, du séjour en réanimation et la présence d'une trachéotomie. En revanche, aucun critère neurologique n'était associé à une augmentation du risque de POAN. A gravité neurologique égale, il semble donc que les patients développant des POAN présentent un niveau d'inflammation plus élevé (infections, polytraumatisme, chirurgies multiples, réanimation) que les patients sans POAN. Comme pour d'autres pathologies articulaires avec une composante inflammatoire, nous avons infiltré des dérivés cortisonés localement, dans le but de traiter les douleurs induites par certaines POAN. Un mois après l'injection, 80% des patients présentaient un soulagement des douleurs. Ce traitement local paraît être une alternative intéressante à la prise en charge antalgique des POAN douloureux.

Les POAN sont toujours, à l'heure actuelle, diagnostiqués et prises en charge tardivement lors de l'apparition de complications. L'enjeu actuel est d'identifier les patients à risque de développer des POAN, le plus tôt possible après leur accident neurologique de façon à leur assurer un suivi et une prise en charge adaptée et précoce. En se basant sur les études cliniques et les données issues du modèle murin développant des POAN, nous allons relever des critères cliniques et biologiques reconnus comme étant corrélés à l'apparition de POAN dans une base de données clinico-biologique. Ce tout premier travail prospectif sur les POAN permettra de repérer les patients à risque de développer des POAN et peut être à terme d'identifier des cibles thérapeutiques qui permettront de prévenir ou de guérir les POAN.

Title : Neurogenic heterotopic ossification and inflammation

Keywords : heterotopic ossification, neurogenic heterotopic ossification, traumatic brain injury, spinal cord injury, stroke, inflammation, infection

Abstract: Heterotopic ossifications (HO) are abnormal ectopic bone formations that develop in soft tissues. HO can be related to genetic factors or acquired pathologies. HO occurring after central nervous system lesion are called neurogenic HO (NHO). The objective of this project is to identify local and systemic inflammatory factors that may be associated with occurrence of NHO. We study first, the effect of bacterial membrane components on the development of NHO in a mouse model of spinal cord injury triggered by injection of a myotoxic compound into muscle. Local and systemic administration of membrane components from *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* significantly increased the volume of NHO. Changes in the level of inflammation, which was dose responsive, correlated with changes in NHO volume suggesting that inflammation influences NHO formation. As bacterial membrane components were also linked to increased volumes of NHO, it is possible that inflammation triggered by infectious pathogens could also be involved in NHO development. Furthermore, we identified that after reaching a certain threshold of inflammation, triggered by administration of bacterial membrane components, spinal cord injury was not required for NHO formation. Further experiments with this model involved determining the effect of blocking neuromuscular signaling on NHO formation. Botulinum toxin injection increased the size of NHO. Therefore, neuromuscular signaling also modulates NHO development in damaged muscles of spinal cord-injured mice. By extension, local neuroinflammation was implicated in regulating neuromuscular signals received by affected muscles. Based on these preclinical results, we carried out a case-control study to look for factors inducing inflammation that could be linked with NHO occurrence, and which occur at early stages after neurological trauma. This study identifies for the first time that patients with *Pseudomonas Aeruginosa*-positive infections were more likely to develop NHO. NHO patients more frequently experience

surgery and polytrauma, compared to patients without NHO. Furthermore, extended stays in intensive care, long periods of mechanical ventilation, enduring coma, or patients with a tracheotomy were more frequent in patient with NHO. In contrast, no neurological factors were associated with a higher risk of developing NHO. Patients with comparable neurological trauma severity were more susceptible to develop NHO when they were experiencing a high level of inflammation (infection, polytrauma, surgeries, intensive care). Like for other inflammatory joint pathologies, we performed a further study which involved the infiltration of NHO with corticosteroid locally, in order to treat pain induced by NHO formation. One month after treatment, 80% of patients reported an improvement of pain. Therefore, we demonstrate that corticosteroid infiltration at the site of NHO is an effective treatment for pain associated with NHO. Detecting patients that are at risk to develop NHO as early as possible after an accident is imperative, to adapt rehabilitative strategies or treatment needs specific for patients that develop NHO. However, NHO diagnosis occurs during late phase of disease, when complications are occurring. To address this shortfall in the detection of NHO formation, we are undertaking the first prospective study of NHO, where clinical and biological information will be recorded to make a database. The specific data to be collected has been defined by our previous research in the mouse model and earlier clinical studies, and will identify specific biological and clinical factors that can be monitored to identify patients at risk to develop NHO. The outcomes of this project have specific implications in the understanding the drivers of NHO formation and its detection. Global outcomes of this project include improving patient management and possibly the prevention of NHO formation in patients.