

# Applications de la chirurgie régénératrice en orthopédie : Défis de l'ingénierie tissulaire osseuse en 2017

## Engineering Bone: Challenges and Obstacles in 2017

Hervé Petite

*Laboratoire de Bio ingénierie et Bio imagerie ostéoarticulaire UMR CNRS 7052.  
UFR de Médecine, Université Paris Diderot, France.*

### Résumé

Au niveau mondial, plus d'un million de greffes osseuses (greffe osseuse autologue ou utilisation d'os de banque) sont réalisées annuellement pour traiter des insuffisances de la réparation osseuse dans des pathologies ostéoarticulaires. Parce qu'elle est histocompatible et non immunogène, la greffe osseuse autologue prélevée sur des sites donateurs tels que la crête iliaque, est l'option la plus souvent utilisée. En effet, l'autogreffe osseuse est par essence ostéoconductrice (elle procure un support sur lequel les cellules peuvent adhérer, proliférer et se différencier), ostéoinductrice (elle induit la prolifération de cellules indifférenciées et leur différenciation en ostéoblastes) et ostéogène (elle est un réservoir de cellules souches ostéocompétentes). Cependant, son utilisation est une source supplémentaire de morbidité augmentant les temps et les coûts opératoires. Pour pallier ces difficultés, des recherches expérimentales visant à développer des méthodes alternatives dont l'efficacité thérapeutique est au moins équivalente à celle de l'autogreffe, sont actuellement développées.

La possibilité d'obtenir à partir d'une biopsie de moelle osseuse un grand nombre de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et celle de les différencier en cellules capables de former du tissu osseux a conduit naturellement à évaluer l'intérêt de ces cellules comme substituts de l'autogreffe osseuse. Le principe est de transplanter, au niveau de la lésion, des CSMs préalablement mises en place dans un matériau support poreux ; l'ensemble étant appelé biohybride osseux. L'intérêt de cette stratégie thérapeutique, dans le comblement de perte de substance osseuse dont le volume est de pertinence clinique, a été démontré par notre groupe chez la brebis en utilisant des CSMs dérivées de la moelle osseuse. Malgré ces études expérimentales encourageantes et la publication de quelques cas cliniques suggérant un intérêt des CSMs dans la réparation osseuse, il n'existe pas d'étude clinique randomisée prospective démontrant un intérêt réel de l'utilisation des CSMs. L'objectif de ma présentation sera d'effectuer une brève revue de la littérature du domaine et de préciser les défis à surmonter afin de transférer dans les conditions optimales à la clinique cette nouvelle stratégie thérapeutique.

### Mots clés

- ◆ Tissu osseux
- ◆ Réparation osseuse
- ◆ Régénération osseuse
- ◆ Autogreffe osseuse
- ◆ Allogreffe osseuse
- ◆ Cellules souches mésenchymateuses
- ◆ Protéines de la morphogénèse osseuse
- ◆ Ingénierie tissulaire
- ◆ Défaut osseux

### Abstract

Repair of large bone defects is a challenge for the orthopaedic surgeon. In these complex clinical conditions, the autologous bone grafts are the benchmarks as they are osteoconductive (they provide a scaffold on which bone cells can proliferate), osteoinductive (they induce proliferation of undifferentiated cells and their differentiation into osteoblasts), and osteogenic (they provide a reservoir of skeletal stem and progenitor cells that can form new bone). However, autologous bone grafting adds significant morbidity to the surgical procedure. These disadvantages have prompted an ongoing search for alternative methods including the use of banked bone, synthetic or natural bone substitutes, bone morphogenetic proteins and osteocompetent cells. In this review, we delineate, from an engineering perspective, the progress that has been made to date and the challenges remaining in using or in successfully translating these approaches to the clinics.

### Keywords

- ◆ Bone
- ◆ Bone repair
- ◆ Bone regeneration
- ◆ Autologous bone graft
- ◆ Mesenchymal stem cells
- ◆ Bone morphogenetic proteins
- ◆ Tissue engineering

Le tissu osseux est - après le sang - le tissu le plus transplanté. Au niveau mondial, il est estimé que plus d'un million de greffes osseuses sont effectuées annuellement, suite à des complications post-fracturaires d'origine mécanique ou biologique. De surcroît, les avancées thérapeutiques en orthopédie mettent souvent à mal les capacités naturelles de réparation de l'os. En effet, le traitement de tumeurs, de kystes ou encore la jugulation d'infection nécessitent souvent l'exérèse de pièces osseuses de taille trop importante pour que le processus naturel d'autoréparation puisse, à lui seul, induire une consolidation osseuse.

### Correspondance

*Hervé Petite*

*B2OA UMR CNRS INSIS 7052 - UFR de Médecine - Université Paris Diderot - 10, avenue de Verdun 75010 Paris.*

*E-mail : herve.petite@univ-paris-diderot.fr*

## L'autogreffe osseuse : traitement de référence

Le comblement de ces défauts est alors généralement assuré chirurgicalement par la transplantation d'un greffon osseux autologue prélevé au niveau des crêtes iliaques. L'autogreffe est considérée comme le « matériau de référence » en matière de substitut osseux car elle possède tous les éléments nécessaires à la formation osseuse : une matrice minéralisée, des facteurs de croissance et des cellules ostéocompétentes.

Ces éléments lui confèrent trois propriétés complémentaires :

- ostéoconduction : propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact de ce matériau ;
- ostéoinduction : propriété d'un matériau qui contient des protéines de la morphogénèse osseuse (BMPs) et dont la libération va induire le recrutement local de cellules ostéocompétentes et provoquer leur différenciation en ostéoblastes capables de synthétiser une matrice osseuse minéralisable ;
- ostéogénicité : propriété d'un matériau contenant des cellules ostéocompétentes capables de synthétiser un tissu osseux.

Cependant, malgré son intérêt, l'autogreffe possède un certain nombre d'inconvénients. Sa collecte entraîne l'apparition de douleurs importantes au site de prélèvement et peut s'accompagner d'une morbidité non négligeable (hématomes, abcès et ou névralgies...). Elle n'est, de plus, pas toujours possible puisque la quantité d'auto-greffon prélevable est limitée, en particulier chez l'enfant.

## Allogreffes et substituts osseux

Pour pallier ces difficultés, des méthodes alternatives ont été développées ; L'alternative la plus directe de l'autogreffe étant l'allogreffe osseuse. Mac Even, à Glasgow, aurait réalisé en 1878 la première allogreffe osseuse. Les premières banques françaises de tissu osseux ont, elles, vu le jour autour des années 1980 (1). L'allogreffe osseuse est obtenue soit à l'occasion d'arthroplastie totale de hanche, soit au cours de prélèvements multiples (2). Sa mise en forme et sa conservation sont effectuées par les banques d'os.

Les complications liées aux prélèvements de l'autogreffe osseuse ainsi que les risques potentiels d'ordre infectieux et immunologiques des allogreffes, ont incités à développer des substituts osseux. La Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFOT) propose de définir un substitut osseux comme « Tout biomatériau d'origine humaine, végétale ou synthétique (i) destiné à l'implantation chez l'homme ; (ii) dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux ; (iii) par le renforcement d'une structure osseuse ou le comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique ». Ces substituts osseux sont utilisés dans des pathologies très diverses concernant la chirurgie orthopédique, crano-maxillo-faciale et reconstructive, stomatologique, oto-rhino-laryngologique et dentaire ; les pertes de substance pouvant être d'origine traumatique, tumorale ou dégénérative. On distingue, en fonction de leur origine, les substituts osseux synthétiques et les substituts osseux issus de dérivés de tissus d'origine animale non viables ou en comportant. Les substituts osseux à base d'hydroxyapatite ou de phosphate de calcium tricalcique (BTCP) sont les substituts osseux synthétiques les plus couramment utilisés. L'hydroxyapatite synthétique n'étant dégradé que très lentement in vivo, les fabricants modulent sa vitesse de dégradation en y ajoutant du BTCP. Plus le rapport BTCP / hydroxyapatite est élevé, plus la dissolution est rapide (pour revue (2,3)). Les substituts osseux issus de dérivés de tissus d'origine animale ont pour origine soit l'exosquelette de corail (Biocoral®, Interpore®) soit l'os, par exemple d'origine bovine (Bio-oss®, Orthoss®). Ces matériaux sont, soit simplement récoltés, nettoyés (élimination de la matrice organique) et stérilisés, soit soumis à un processus de céramisation (pour revue (4)).

## Régénérer le tissu osseux à l'aide de facteurs de croissance

Plus récemment, les avancées de la biologie cellulaire et du développement ont permis d'augmenter le potentiel régénératif du tissu osseux lésé, par exemple en y ajoutant des facteurs de croissance. L'hypothèse sous-jacente à l'utilisation des facteurs de croissance est qu'il est possible d'altérer le cours d'événements clés de la cicatrisation osseuse en modifiant la concentration locale d'un ou de plusieurs facteurs de croissance. Les facteurs les plus utilisés en clinique sont les protéines de la morphogénèse osseuse (BMPs). Plus spécifiquement, les BMP-2 et BMP-7 sont utilisées en clinique sous le nom commercial d'INDUCTOS® et d'OSIGRAFT®, respectivement (pour revue (4)). Dans ces formulations, les BMPs se présentent sous forme liquide. De façon extemporanée, elles sont imbibées sur une éponge de collagène puis, après 15 minutes d'incubation, l'ensemble est mis en place au niveau du site lésé. Malgré des résultats cliniques très encourageants, en particulier dans le cadre de l'arthrodèse vertébrale, un nombre croissant de complications est rapporté lors de l'usage de BMPs ((5)). On peut citer entre autres des formations osseuses ectopiques, des ostéolyses de greffe intersomatique ou plus grave des dysphagies, œdèmes du cou.... L'utilisation de doses supraphysiologiques serait à l'origine des effets secondaires des BMPs en clinique. Actuellement, les chercheurs développent des supports de délivrance pour permettre (i) un confinement des BMPs au niveau du site lésé, et (ii) leur délivrance à dose réduite avec un profil pharmaco-cinétique optimisé de libération ; l'objectif étant de limiter les effets secondaires observés en clinique tout en maintenant le potentiel ostéoinducteur.

## Régénérer le tissu osseux à l'aide de cellules souches

En France, c'est Jean Bernard qui eut le premier l'intuition d'une médecine régénératrice à partir de cellules souches. En 1973, dans son ouvrage « Grandeurs et tentations de la Médecine », il déclarait « *Il est dès maintenant possible d'observer in vitro, dans les bouteilles de verre du laboratoire, les premières étapes de la différenciation de cellules indifférenciées soumises aux inducteurs voulus. Il sera bientôt possible d'aller plus loin dans cette voie, d'obtenir des cellules, puis des organes hautement spécialisés, un foie, un cœur, un cartilage, un os* » (6). Lorsqu'on applique cette proposition à la

réparation du tissu osseux, le principe est alors de transplanter, au niveau de la lésion, des cellules ostéocompétentes préalablement mises en place dans un matériau support poreux. Cette association de cellules ostéocompétentes et d'un matériau poreux est communément appelée un produit d'ingénierie tissulaire osseuse (PITO). Le scénario clinique originalement envisagé est présenté sur la figure 1. L'hypothèse sous-jacente originelle était que les cellules ostéocompétentes survivent à la transplantation, prolifèrent, se différencient en ostéoblastes et apposent un néo tissu osseux à la surface du matériau. Celui-ci se résorbe de façon concomitante à la néoformation osseuse pour laisser place à un tissu osseux fonctionnel.

### Source de cellules ostéocompétentes

Les caractéristiques d'une source optimale de cellules ostéocompétentes pour la médecine régénératrice incluent l'absence de réaction du greffon contre l'hôte, l'absence de tumorigénicité, une disponibilité immédiate des cellules en quantité suffisante, une prolifération cellulaire contrôlée et un potentiel ostéogène prédictible et reproductible. Les cellules ostéocompétentes à greffer peuvent soit provenir du patient (autologue) ou d'un autre patient (allogénique) ; le niveau de risques est plus important pour une source cellulaire allogénique mais celle-ci offre des perspectives de développement de marché et d'économies d'échelle importantes.

Théoriquement, les cellules ostéocompétentes peuvent être dérivées à partir de cellules souches embryonnaires, cellules souches induites à la pluripotence ou encore de cellules souches adultes tissulaires. Ces dernières, et en particulier les CSMs isolées à partir de la moelle osseuse (le réservoir naturel de cellules ostéocompétentes), sont étudiées depuis plus de vingt-cinq ans par de nombreuses équipes qui ont exploré la possibilité de les utiliser pour la réparation osseuse. Ces cellules sont obtenues en mettant en culture des cellules de moelle osseuse dont on ne conserve que la fraction adhérente. C'est Friedenstein qui a donné les premières preuves de l'existence de cellules progénitrices du tissu osseux dans la moelle osseuse en cultivant *in vitro* la fraction adhérente au plastique de la moelle osseuse (7). Il fut ensuite démontré que les CSMs se différenciaient en ostéoblastes, chondroblastes ou adipocytes et ce, en fonction des conditions de culture (pour revue voir (8)). Notons cependant que les CSMs ne possèdent pas de capacité d'autorenouvellement et que leur « souchitude » fait débat. Elles ont été renommées récemment cellules stromales multipotentes ; l'acronyme CSM restant valable...

### Cahier des charges du matériau support

La formation osseuse requiert un support physique sur lequel cellules ostéocompétentes adhèrent, migrent et prolifèrent. Ce processus est toujours accompagné d'une néovascularisation, d'où la sélection de matériaux poreux. Idéalement, les pores doivent être interconnectés afin de favoriser une angiogenèse rapide et complète de l'implant. Leur taille doit être supérieure à 150 µm pour permettre la néoformation osseuse (9). Le but ultime étant d'obtenir un comblement du défaut par de l'os, l'utilisation d'un matériau résorbable sera préférée : l'idéal est que le matériau se résorbe à la même vitesse que l'ostéogenèse de manière à profiter, initialement, des propriétés mécaniques du matériau et à obtenir ultérieurement son remplacement complet par du tissu osseux.

### Établissement de la preuve du concept chez l'animal

L'intérêt thérapeutique des CSMs dérivées de la moelle osseuse a été démontré chez le petit animal en site ectopique (10) puis orthotopique chez le rongeur. Toutefois, la pertinence clinique de ces résultats reste discutable au vu de la petite taille des défauts osseux créés. Des études précliniques ont alors été effectuées chez le gros animal sur des os porteurs ; le volume des défauts osseux étant de pertinence clinique. La preuve du concept de l'intérêt de cette stratégie thérapeutique a été obtenue en ensemençant les CSMs soit sur des céramiques à base d'hydroxyapatite (11), d'hydroxyapatite / B-TCP (12) ou de l'exosquelette de corail du genre Porites (13) (Fig 2) ou Acropora (14). Malgré des résultats encourageants, les performances de ces PITOs doivent être améliorées pour obtenir une efficacité thérapeutique équivalente à celle de l'autogreffe osseuse.

### Défis en ingénierie tissulaire osseuse

Les raisons du potentiel ostéogène limité des PITOs ne sont pas entièrement comprises mais la mort massive des CSMs post-implantation ainsi que l'absence de couplage entre la résorption du matériau et la néoformation osseuse sont des enjeux dont la résolution devrait permettre d'accroître de façon importante l'efficacité thérapeutique de ces PITOs.

### Améliorer la survie des CSMs transplantés

La forte mortalité cellulaire (80-90 %) post-implantation constitue un problème majeur dont l'origine est probablement multifactorielle et pourrait inclure une composante immuno-inflammatoire locale suite au geste chirurgical, une diminution locale de facteurs trophiques ou encore l'ischémie locale qui perdure jusqu'à la revascularisation de l'implant. Cette ischémie serait particulièrement préjudiciable à la survie des CSMs lorsque des défauts de grandes tailles (> 1 cm<sup>3</sup>) sont traités. En effet, la diffusion passive d'O<sub>2</sub> n'est effective qu'à une distance de 150-200 µm d'une source vasculaire (15-17). Afin de mieux comprendre l'impact respectif des composantes principales de l'ischémie (i.e. déplétion en oxygène et nutriments) sur la mort des CSMs post-implantation, nous avons étudié *in vitro* le rôle respectif de l'oxygène et du glucose dans la survie des CSMs en fonction de la pression partielle en oxygène. De façon très surprenante, les CSMs se sont avérées survivre et rester fonctionnelles en absence d'oxygène (anoxie) pourvu qu'elles aient accès à une source de glucose. En d'autres termes, le glucose (et non l'oxygène) est indispensable à la survie des CSMs (18,19). Ce rôle majeur du glucose dans la survie des CSMs post-implantation a été confirmé *in vivo* dans un modèle ectopique murin où une survie accrue des CSMs implantées ainsi qu'une accélération de la revascularisation péri-implantaire étaient observées en présence de glucose (19). Le défi est maintenant de transférer cette connaissance en un outil thérapeutique en développant une nouvelle génération de matériaux capable de servir de support aux CSMs et de délivrer du glucose à des doses physiologiques.

### Harmoniser vitesse de résorption du matériau support et de formation osseuse

Les matériaux supports utilisés pour développer des produits d'ingénierie du tissu osseux ont été choisis jusqu'à ce jour pour leur caractère biocompatible et ostéoconducteur. Cependant, à la différence du remodelage osseux où il existe un couplage

étroit entre ostéoformation et ostéorésorption via un dialogue étroit entre une multitude de types cellulaires et des interactions avec les facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse, il n'existe pas de matériau démontrant un couplage entre ostéoformation et résorption du biomatériau. Pour contrôler la vitesse de résorption du matériau, on peut jouer sur une modulation de l'architecture interne des implants en jouant sur le volume de porosité, la taille des pores, les microporosités... À ce titre, les procédés de fabrication additives ont un intérêt majeur. En effet, alors que les procédés conventionnels utilisés pour la mise en forme des matériaux (moulage, usinage...) ne permettaient pas la réalisation d'implants d'architecture interne complexe, les procédés de fabrication additive permettent de réaliser sur mesure des implants avec une structure interne complexe parfaitement définie. Alternativement, la composition chimique du matériau support peut être adaptée. Ainsi, il existe un ratio optimal entre HA et TCP (20 % / 80 %) pour des BCP combinés à des CSMs pour promouvoir la formation osseuse un modèle ectopique murin (20).

## Conclusion

La compréhension intime que l'on a de l'embryogénèse et de la réparation osseuse a permis d'identifier des effecteurs cellulaires (les cellules souches) et moléculaires (les BMPs) clés de la réparation osseuse. L'association de ces effecteurs avec des matrices permettant leur délivrance permet d'obtenir une nouvelle génération de matériaux dont l'ambition est de non seulement de réparer la fonction mécanique déficiente du tissu osseux mais aussi d'obtenir sa réparation *ad integrum*. Si ces PITO présenteront vraisemblablement à terme une efficacité thérapeutique très supérieure à celui des biomatériaux classiques, des développements sont encore nécessaires pour délivrer de façon satisfaisante leur composante biologique. Ainsi, une utilisation optimale des BMPs requiert le développement de support permettant à la fois leurs confinements sur le site lésé et leurs délivrances à des doses efficaces pendant un temps suffisant. De même, un usage rationnel de cellules souches requiert la mise au point de matériaux ou méthodes capable, (i) d'au moins temporairement, prolonger la survie des cellules transplantées et (ii) d'harmoniser vitesse de résorption du matériau et formation osseuse.

## Discussion en séance

### Question de X Martin

Quand on a une plaie et que cette plaie cicatrise, quelle est la nature des cellules qui permettent cette cicatrisation ?

#### Réponse

Les plaquettes, les neutrophiles, les macrophages, et les fibroblasts sont des acteurs essentiels du processus de cicatrisation cutané. Ils délivrent localement des cytokines (interleukines, TNF- $\alpha$ , et facteurs de croissance dont le PDGF, VEGF...). De plus, l'application thérapeutique de cellules souches mésenchymateuses améliore la cicatrisation (Pour revue Dylan E. Lee 2016 (1)). Via ces effets paracrines, l'addition de cellules souches mésenchymateuses accélérerait la fermeture de la plaie, augmenterait la ré-épithélialisation et l'angiogenèse, promouvoir la formation d'un tissu de granulation, modulerait l'inflammation, et régulerait le remodelage de la matrice extracellulaire.

Ref : (1) Dylan E. Lee, Nagi Ayoub, and Devendra K. Agrawal « Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy ». *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7: 37. Published online 2016 Mar 9. doi: 10.1186/s13287-016-0303-6.

### Question d'A Le Duc

Dans un processus de cicatrisation, quelle est la matière des cellules qui entrent en jeu ? Y a-t-il des cellules souches semblables à celles que vous injectez ?

#### Réponse

Dans le processus de cicatrisation osseuse, en sus des cellules inflammatoires, sont impliquées des cellules ostéoformatrices (cellules du périoste, cellules souches mésenchymateuses, pré-ostéoblastes et ostéoblastes) et des cellules ostéorésorbantes (ostéoclastes). Il faut cependant préciser que le terme cellules souches mésenchymateuses correspond à une population cellulaire hétérogène (isolée par adhésion préférentiel au plastique) et que seulement certaines de ces cellules ont le potentiel de se différencier en cellules ostéoformatrices.

### Question de P Marre

Quelle intention auprès des pouvoirs publics ?

#### Réponse

-Expliquer l'impérieuse nécessité d'une recherche fondamentale amont permettant de développer des stratégies thérapeutiques de façon rationnelle.

-Promouvoir le développement d'appels d'offre pour des projets « Preuves de concept » avec des financements intermédiaires (environ 100.000€).

-Promouvoir des essais expérimentaux et cliniques comparatifs et indépendants entre différentes stratégies thérapeutiques afin d'identifier les meilleures solutions pour chaque indication thérapeutique. A titre d'exemple, il existe pléthore de substituts osseux sur le marché mais il n'existe pas d'étude comparative permettant d'effectuer un choix rationnel entre ces différents substituts.

## Références

1. Vastel L. Allogreffes osseuses et ostéochondrales. In Chirurgie orthopédique: principes et généralités AC Masquelet, Elsevier Masson editor 2004.
2. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.* John Wiley & Sons Inc 1991;2:187-208.
3. Daculsi G, Bouler JM, Le Geros RZ. Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int Rev Cytol.* 1997;172:129-91.
4. Deschepper M, Paquet J, Moya A, Manassero M, Bensidhoum M, Petite H. Des biomatériaux à l'ingénierie tissulaire : perspectives en réparation osseuse. *Techniques de l'ingénieur.* 2015;10:1-27.

5. Tannoury CA, An HS. Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *The Spine Journal*. 2014;14:552-9.
6. Bernard J. *Grandeurs et tentations de la Médecine*. Buchet. Chastel edituers. Paris 1973.
7. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6:230-47.
8. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *STEM*. 2008;2:313-9.
9. Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*. 1999;30:599-613.
10. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. 1991;12:253-8.
11. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. John Wiley & Sons, Inc; 2000;49:328-37.
12. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80:985-96.
13. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, De Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. 2000;18:959-63.
14. Manassero M, Viateau V, Deschepper M, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H et al. Bone Regeneration in Sheep Using Acropora Coral, a Natural Resorbable Scaffold, and Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. 2013;19:1554-63.
15. Colton CK. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant*. 1995;4:415-36.
16. Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res*. 1986;46:5320-9.
17. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*. 1973;138:745-53.
18. Deschepper M, Oudina K, David B, Myrtil V, Collet C et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011;15:1505-14.
19. Deschepper M, Manassero M, Oudina K, Paquet J. Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells*. 2013;31:526-35.
20. Arinze TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. 2005;26:3631-8.

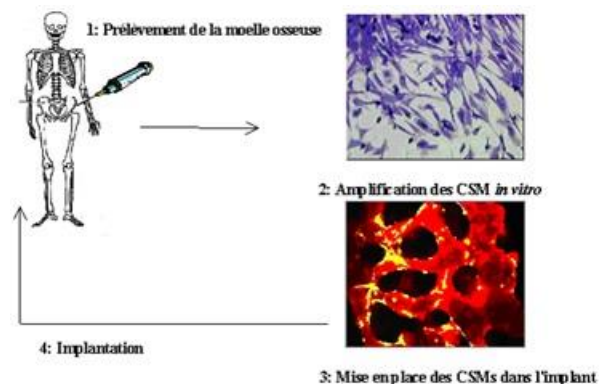


Figure 1 : Le scénario clinique envisagé comprend quatre étapes :

- 1-une biopsie médullaire ;
- 2-un isolement et amplification du nombre de CSMs en flasque de culture ou bioréacteur ;
- 4-le biohybride est implanté en lieu et place de la perte de substance osseuse.

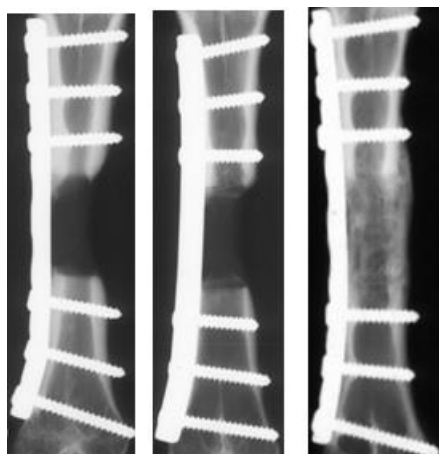


Figure 2 : Radiographies (de gauche à droite) à 16 semaines d'un défaut au niveau du métatarsien laissé vide, comblé par un substitut osseux à base de corail Porites ou d'un PITO contenant des CSMs. 3/7 animaux dont le défaut était comblé par un PITO présentait une consolidation clinique à 16 semaines.