

Ingénierie d'un lambeau osseux vascularisé à destinée maxillofaciale : les limites techniques

Engineering a bone free flap for maxillofacial reconstruction: Technical restrictions

G. Raoul^{a,b,c,*}, L. Myon^{a,b,c}, F. Chai^{a,b}, N. Blanchemain^{a,b}, J. Ferri^{a,b,c,d}

^a Université Lille Nord-de-France, UDSL, 59000 Lille, France

^b Unité Inserm U1008, médicaments et biomatériaux à libération contrôlée, 59000 Lille, France

^c Département universitaire de chirurgie maxillofaciale et stomatologie, hôpital Roger-Salengro, CHU de Lille, rue du Professeur-Emile-Laine, 59000 Lille, France

^d AIMOM (association internationale de médecine orale et maxillofaciale), 59650 Villeneuve-d'Ascq, France

Disponible en ligne sur

 **ScienceDirect**
 www.sciencedirect.com

Summary

Vascularisation is a key for success in bone tissue engineering. Creating a functional vascular network is an important concern so as to ensure vitality in regenerated tissues. Many strategies were developed to achieve this goal. One of these is cellular growth technique by perfusion bioreactor chamber. These new technical requirements came along with improved media and chamber receptacles: bioreactors (chapter 2). Some bone tissue engineering processes already have clinical applications but for volumes limited by the lack of vascularisation. Resorbable or non-resorbable membranes are an example. They are used separately or in association with bone grafts and they protect the graft during the revascularization process. Potentiated osseous regeneration uses molecular or cellular adjuvants (BMPs and autologous stem cells) to improve osseous healing. Significant improvements were made: integration of specific sequences, which may guide and enhance cells differentiation in scaffold; nano- or micro-patterned cell containing scaffolds. Finally, some authors consider the patient body as an ideal bioreactor to induce vascularisation in large volumes of grafted tissues. "Endocultivation", i.e., cellular culture inside the human body was proven to be feasible and safe. The properties of regenerated bone in the long run remain to be assessed. The objective to

Résumé

La vascularisation est une des clés du succès en ingénierie tissulaire osseuse. La création d'un réseau vasculaire fonctionnel est une préoccupation importante afin d'assurer la parfaite vitalité des tissus régénérés. Plusieurs stratégies ont été développées pour tenter de relever ce défi. L'une de ces techniques est la culture cellulaire par flux de perfusion et confinement. Ces nouvelles exigences techniques se sont naturellement accompagnées d'une évolution des milieux et réceptacles de cultures cellulaires : les bioréacteurs (chapitre 2). Certains procédés d'ingénierie tissulaire osseuse possèdent déjà des applications cliniques, mais pour des volumes limités par manque de vascularisation. L'utilisation des membranes résorbables ou non-résorbables en sont l'illustration. Seules ou en association avec des greffes osseuses, elles protègent le volume greffé le temps de la revascularisation. La régénération osseuse potentialisée utilise des adjuvants moléculaires ou cellulaires pour optimiser la cicatrisation osseuse. Les biomolécules osteoprogénitrices (BMP) et les cellules souches autologues en sont des exemples. La fonctionnalisation des supports par adjonction de molécules ou de population cellulaire représente une avancée significative. Pour résoudre la problématique de la vascularisation des grands volumes greffés, certains auteurs ont considéré le corps humain comme le bioréacteur idéal. La faisabilité

* Auteur correspondant.

e-mail : gwenael.raoul@gmail.com (G. Raoul).

reach remains the engineering of an “in vitro” osseous free flap without morbidity.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Tissue engineering, Bone, Tissue scaffolds, Neovascularization, Physiologic, Bioreactors

de « l'endocultivation » ou culture cellulaire dans le corps humain, a été démontrée. Les propriétés de l'os régénéré à long terme restent à évaluer. La construction d'un lambeau libre osseux « in vitro » dépourvu de morbidité est l'objectif à atteindre.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Ingénierie tissulaire, Scaffold, Néovascularisation, Physiologique, Bioréacteurs

Introduction

Durant les 40 dernières années, nous avons vu se développer les applications des implants dentaires et des lambeaux libres. Ces techniques sont désormais parfaitement rodées et optimisées, permettant d'offrir des raffinements élevés en termes de « réparation », tant fonctionnels [1] qu'esthétiques [2].

Pour autant, la notion de « régénération » n'est, quant à elle, pas encore pleinement utilisée, notamment par l'absence d'applications cliniques en pratique courante des procédés d'ingénierie tissulaire.

L'application clinique de l'ingénierie tissulaire est la nouvelle étape significative dans notre domaine de compétence oro-cranio-maxillofaciale, pouvant se définir par l'aspect dit « translationnel » des travaux de recherche qui permettent de transposer directement les résultats des expérimentations fondamentales dans le domaine d'application clinique. La problématique de la vascularisation s'impose alors, compte tenu des volumes régénérés.

Nous voyons ainsi se déployer une coopération entre les sciences fondamentales (biologie cellulaire et moléculaire, chimie et pharmacie) et les disciplines cliniques (toutes les spécialités médicales).

L'intérêt clinique des techniques de régénération est indiscutable et fait appel principalement aux techniques d'ingénierie tissulaire [3]. D'ailleurs, sur les 19 569 568 articles présents dans Medline, 37 874 (0,2 %) répondent à l'ingénierie tissulaire, dont plus d'un tiers (33,6 %) sont dédiés au tissu osseux, 8,6 % au tissu vasculaire et 5,8 % au tissu dentaire. Nous voyons ainsi le tissu osseux apparaître comme une préoccupation majeure de l'ingénierie tissulaire.

L'ingénierie tissulaire osseuse s'attache donc à « re-crée » l'agencement histologique et fonctionnel de l'organe ou du fragment de tissu manquant ou défaillant. Elle se heurte à la problématique de la vascularisation, dès lors que le volume tissulaire régénéré est trop important et ne peut donc pas « attendre » la colonisation par les vaisseaux receveurs des tissus environnants.

Les techniques de régénération peuvent s'envisager de trois façons : par assemblage in vitro de plusieurs unités élémentaires, par l'induction in vivo de l'ensemble à reconstruire, soit, enfin par l'association de ces deux techniques :

- la reconstruction in vitro nécessite l'assemblage des différents éléments in vitro (*scaffold*, cellules, biomolécules, signaux et l'utilisation de bioréacteurs pour assurer la perfusion nécessaire) ;
- l'induction de l'ensemble à régénérer in vivo nécessite des conditions appropriées (thérapie génique, distraction, biomolécules, parfaite vascularisation du tissu receveur) ;
- enfin, l'association des deux étapes se révèle plus complexe. Elle nécessite une culture cellulaire in vitro préalable sur un support ou une matrice appelé *scaffold*, puis un transfert de l'ensemble dans une situation anatomique bien vascularisée. Cet ensemble sera éventuellement transféré secondairement au niveau de la région à reconstruire (procédé de l'endocultivation [4] ou de l'utilisation du corps humain comme un bioréacteur).

Finalement, à titre de dénominateur commun, nous allons retrouver une notion toute chirurgicale et très spécifique à notre spécialité qui est celle de la notion de la vascularisation [5]. Dès lors qu'un certain volume et une certaine épaisseur de greffon sont atteints, le recours aux greffes vascularisées est incontournable, sous peine d'échecs et de perte de la greffe. Concernant l'ingénierie tissulaire osseuse, le cahier des charges établit clairement qu'il faut s'affranchir du prélèvement osseux autologue et que le but de l'ingénierie tissulaire osseuse est de régénérer les organes ou les fonctions déficientes, en d'autres termes créer in vitro un lambeau libre composite sur mesure.

En effet, depuis que les greffes osseuses autologues sont utilisées, elles sont divisées en deux groupes : les non-vascularisées et les vascularisées. Dans les deux cas, au sein du greffon osseux, il existe un réseau vasculaire, soit fonctionnel (perfusé par le pédicule), soit non fonctionnel (lambeau non perfusé), mais contenant, dans les deux cas, toute la structure cellulaire et extracellulaire osseuse et vasculaire, sans compter les biomolécules. Ainsi, les greffes autologues, bien que non vascularisées, contiennent une organisation vasculaire intrinsèque ainsi que la cellularité spécifique leur conférant une capacité élevée d'induction de l'ostéogénèse.

L'intégration du réseau vasculaire et des cellules osseuses dans le biomatériau constitue la première étape à accomplir pour hisser le niveau d'ostéo-intégration et d'ostéo-induction

des tissus issus de l'ingénierie osseuse au niveau des greffons autologues.

matique de la vascularisation, puis étudierons les techniques de développement de cette dernière pour terminer par les applications cliniques.

Plan du chapitre

- I. Introduction
- II. Problématique de la vascularisation
 - II.1. Structure d'un greffon osseux
 - II.2. Les types de greffons osseux utilisés en clinique
 - II.2.1. Les greffons non vascularisés
 - II.2.2. Les greffons vascularisés
 - II.3. Vascularisation et ingénierie tissulaire en chirurgie maxillofaciale
 - II.3.1. Vascularisation par imbibition
 - II.3.2. Les techniques de culture cellulaire
 - II.3.2.1. La culture statique
 - II.3.2.2. La culture en flux
 - II.3.2.3. La culture en flux de perfusion
 - II.3.2.4. Bioréacteur confiné
- III. Techniques de développement de la vascularisation et notion de prévascularisation
 - III.1. Dérouter un pédicule vasculaire
 - III.2. Induction d'un réseau vasculaire en ingénierie tissulaire
 - III.2.1. Le scaffold
 - III.2.2. Les signaux
 - III.2.3. Les co-cultures cellulaires
 - III.2.4. Le biomimétisme
- IV. Applications cliniques de l'ingénierie tissulaire osseuse
 - IV.1. Régénération osseuse guidée
 - IV.1.1. La régénération tissulaire osseuse
 - IV.1.2. Utilisation des membranes
 - IV.1.2.1. Principe des membranes
 - IV.1.2.2. Descriptif des membranes
 - IV.1.2.3. Indications et utilisation des membranes
 - IV.2. Régénération osseuse potentialisée
 - IV.3. Les techniques de culture cellulaire et de vascularisation
 - IV.3.1. Les moyens techniques
 - IV.3.2. Les illustrations pratiques
 - IV.4. L'endocultivation
- V. Limites techniques de l'ingénierie tissulaire osseuse
 - V.1. La notion d'organe osseux versus tissus osseux
 - V.2. L'importance du tissu hématopoïétique
 - V.3. L'origine des tissus

Problématique de la vascularisation

Structure d'un greffon osseux

Si nous reprenons d'une manière pragmatique la structure d'un greffon osseux, telle que nous pourrions la présenter à un ingénieur sous forme d'un cahier des charges, nous retrouverions : une trame phosphocalcique autour d'un réseau collagénique, une structure macroporeuse pour l'os trabéculaire, une structure haversienne pour l'os cortical, l'ensemble conférant à ce support une résistance biomécanique très particulière et un substrat pour les différentes cellules. Ensuite, nous retrouvons la phase protéique, qui compose, en partie, la matrice extracellulaire et les biomolécules dont la liste n'est pas encore exhaustive [6].

Ce greffon osseux peut également être étudié au niveau cellulaire. Les cellules les plus spécifiques sont les cellules osseuses (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes), mais il ne faut pas oublier les cellules adipocytaires, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les cellules hématopoïétiques sont également présentes avec la totalité des lignées sanguines, dont une bonne partie du système immunitaire.

Ensuite, arrive l'organisation spatiale de ces cellules, avec les cellules osseuses au contact de la trame phosphocalcique et collagénique, les capillaires guidant le flux sanguin nourricier dans les moindres interstices de la structure macroporeuse, le tout reposant sur une matrice extracellulaire, au contact de cellules adipocytaires et hématopoïétiques. Enfin, toute cette structure fonctionnelle est connectée directement au réseau vasculaire extracapillaire dont les diamètres sont adaptés et adaptatifs (cellules musculaires lisses) aux conditions locales de perfusion, par l'intermédiaire d'une vascularisation centromédullaire pour les os long et aussi d'une vascularisation périostée.

Les types de greffons osseux utilisés en clinique

Ils se divisent en greffons non vascularisés et vascularisés.

Les greffons non vascularisés

Concernant les greffons non vascularisés, les questions du volume ainsi que des capacités de revascularisation du site receveur ont toujours été appréhendées finement, par les études cliniques et l'expérience de l'opérateur afin de garantir un taux de réussite élevé [7].

Les greffons vascularisés

Pour ce qui est des greffes vascularisées, elles font appel à la technique spécifique d'un pédicule nourricier qui est soit laissé attaché à son origine (lambeau pédiculé), soit séparé

Guidés par la problématique de la vascularisation, qui nous servira de trame, nous allons dresser un bilan de l'avancée des techniques d'ingénierie tissulaire appliquée aux tissus durs oro-craniofaciaux. Nous replacerons, tout d'abord, la problé-

de son origine et revascularisé par technique d'anastomose microchirurgicale (lambeau libre), permettant ainsi de disposer d'un greffon osseux dans n'importe quelle situation clinique défavorable (terrain radique ou infecté), dans la mesure où il apporte sa propre vascularisation et ses capacités de cicatrisation. Sa remise en fonction est immédiate lors du déclampage des anastomoses microchirurgicales et nous permet d'observer un retour veineux physiologique, attestant de la consommation et de l'utilisation du sang perfusé par l'artère nourricière, y compris pour des lambeaux de petit volume.

Vascularisation et ingénierie tissulaire en chirurgie maxillofaciale

Vascularisation par imbibition

Pour ce qui est de l'ingénierie tissulaire osseuse maxillofaciale (et dans les autres domaines nécessitant des greffes osseuses), nous sommes rapidement confrontés à la problématique de la vascularisation du tissu issu de l'ingénierie [8], quelle que soit la technique employée. En effet, si nous prenons l'exemple d'une culture cellulaire réalisée sur un *scaffold* adapté (porosité, résistance primaire) dans un bioréacteur assurant un flux de perfusion autour du *scaffold* [9], nous obtenons un tissu dont les capacités d'ostéo-induction sont très proches de celles d'une greffe autologue. Malheureusement, la cellularité en profondeur de ce biomatériau est souvent pauvre, faute d'un réseau vasculaire dédié et faute d'apport de nutriments et d'oxygène en quantité suffisante passés les quelques micromètres de profondeur du biomatériau (fig. 1).

En effet, même si la culture dans le bioréacteur permet d'assurer partiellement un flux nutritif en profondeur, une fois transplanté dans le site vivant, ce flux s'arrête et seule l'imbibition de contact assure la vitalité sur les premières centaines de micromètres. En effet, dans le corps humain, on ne retrouve pas de cellule vivante au-delà de 100 à 200 μm de distance d'un capillaire [10].

Qui plus est, les types cellulaires retrouvés dans les biomatériaux issus de culture cellulaires sont plutôt représentés par les cellules osseuses et contiennent rarement des cellules endothéliales ou adipocytaires, car les contraintes de la co-culture cellulaire sont élevées et il existe souvent une compétition entre les cellules.

Ainsi, avec l'amélioration constante des techniques de culture cellulaire, la maîtrise des signaux, le *bioprinting*, il devient de plus en plus concevable de réaliser des substituts osseux dont les qualités sont très proches des greffes autologues non vascularisées, mais pas encore des greffons vascularisés avec un pédicule autonome.

La finalité de ces travaux est de produire des tissus « sur mesure » adaptés aux caractéristiques tissulaires propres de chaque patient sur des durées courtes. L'étude des signaux biochimiques au cours de la culture cellulaire permet ainsi de réguler l'expression de ces signaux. Les moyens de délivrer ces signaux au bon endroit et au bon moment peut s'envisager en dehors de l'instillation directe, par le biais des microparticules [11], du piégeage au sein des biomatériaux [12], du génie génétique [13,14] ou de l'inclusion dans la matrice elle-même afin d'assurer un certain degré de biomimétisme.

La véritable limitation réside dans l'augmentation du volume greffé [10] et/ou la nature hostile du tissu receveur qui peut difficilement intégrer le tissu transféré dès lors que le volume transféré excède les capacités de revascularisation du site greffé.

Plusieurs procédés tentent de forcer la vascularisation ou tout au moins la circulation des nutriments dans la profondeur du *scaffold*, quelle qu'en soit sa nature (biomatériau, matrice osseuse déminéralisée, hydrogel...), cela afin de favoriser la pousse des cellules et d'assurer leur vitalité.

Les techniques de culture cellulaire

Les techniques de culture cellulaire permettant d'assurer la perfusion au sein de *scaffold* volumineux sont dépendantes des bioréacteurs. À l'image des *scaffolds* qui tendent à être sur

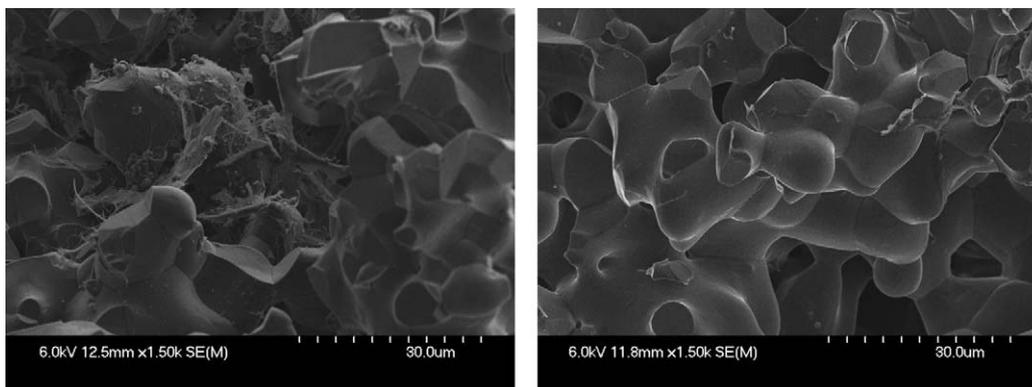


Figure 1. À gauche, aspect du *scaffold* de bêta-TCP après trois semaines de culture en milieu adapté de cellules souches de moelle osseuse de brebis dans un bioréacteur à flux de perfusion. On voit des cellules ostéoblastiques se développer et adhérer à la surface du biomatériau, au sein des macropores. À droite, le même biomatériau dans les mêmes conditions, mais avec une prise de vue réalisée à 50 μm du bord, on note l'absence de cellularité et de colonisation (images du Dr Feng Chai).

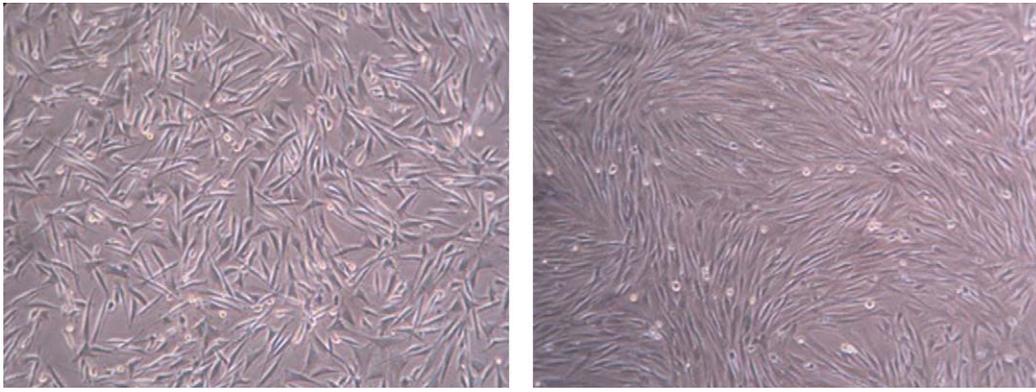


Figure 2. Culture statique de cellules souches de moelle osseuse de brebis à j7 à gauche et j13 à droite (images du Dr Feng Chai).

mesure, le bioréacteur le devient aussi, afin de répartir d'une manière homogène le flux de nutriments.

La culture statique

La culture en milieu statique signifie que le milieu nutritif n'est pas en mouvement et la culture est réalisée en air ambiant, avec les cellules qui sont déposées au fond du support et vont se multiplier pour former une monocouche puis confluer (fig. 2). Elles pourront ensuite être transférées sur un autre support ou utilisées directement.

La culture en milieu statique ne permet pas de coloniser en profondeur un *scaffold*. Le milieu est changé régulièrement en fonction du rythme de croissance des cellules et de leur nombre.

La culture en flux

Afin de pallier le manque de perfusion au sein du *scaffold*, des bioréacteurs avec des flux sont développés, montrant une amélioration par rapport à la culture statique [15]. Le flux avec une pression adaptée est nécessaire pour ne pas arracher les cellules du support. Néanmoins, la perfusion en profondeur n'est pas totalement assurée.

La culture en flux de perfusion

Étant donné que le flux de nutriments issus du milieu de culture ne pénètre pas assez en profondeur, l'idée est donc d'injecter ce flux directement à l'intérieur du *scaffold*, afin qu'il diffuse et ressorte en surface (fig. 3). Pour autant, la perfusion augmente l'acheminement des nutriments et de l'oxygène au sein de la structure, mais tend à arracher les cellules du support, si le flux n'est pas parfaitement contrôlé [16,17].

Bioréacteur confiné

Grayson et al. [18] rapportent la réalisation de la phase osseuse d'un condyle, à partir d'une matrice osseuse déminéralisée taillée sur mesure ; celle-ci a étéensemencée de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) et

le tout a été mis dans un bioréacteur ayant la taille exacte du *scaffold*. Cela réduit l'espace mort dans le volume perfusé au seul volume poreux trabéculaire. La matrice osseuse et le bioréacteur sont sur mesure et garantissent la culture cellulaire au sein de l'ensemble du volume. À ce niveau de contrainte, les microflux au sein de la structure sont étudiés afin de s'assurer d'une perfusion la plus homogène possible. La porosité doit impérativement être calibrée et interconnectée et la disposition des pores doit être étudiée de sorte qu'il n'y ait pas de volume hypoperfusé, quelle que soit la forme anatomique demandée.

Finalement, le contrôle de la perfusion des nutriments et de l'oxygène [19] dans le *scaffold* sont incontournables en matière d'ingénierie tissulaire osseuse. Il s'agit de mimer le processus physiologique de la vascularisation. Le plus difficile est de générer une structure biomécaniquement aussi résistante que l'os avec un réseau vasculaire suffisamment développé dans tout son volume.

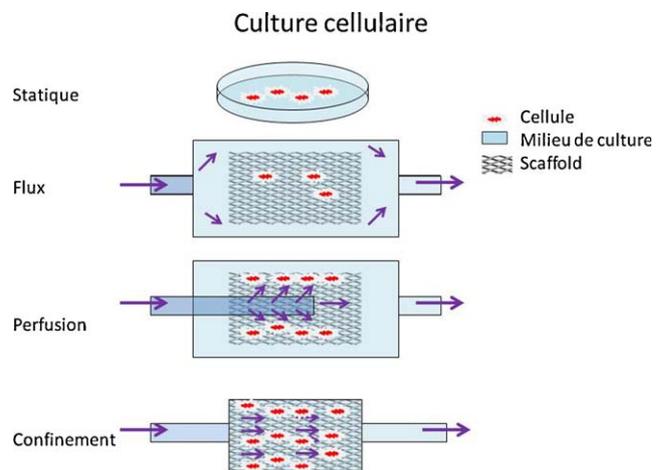


Figure 3. Schématisation des types de culture cellulaire sur *scaffold* au sein des différents types de bioréacteurs mimant la vascularisation.

Techniques de développement de la vascularisation et notion de prévascularisation

Dérouter un pédicule vasculaire

Une des expérimentations animales marquante fut celle de Yao et al. [20] qui ont greffé le radius autologue de lapins dans leur masséter, avec d'un côté l'inclusion de leur artère maxillaire externe et l'autre côté sans. Il s'agissait donc d'un os long, autologue, corticalisé, contenant ou non une artère en son centre. Du côté de la greffe contenant une artère du site receveur dans sa médullaire, l'angiogénèse a été significativement plus importante, mais surtout l'ostéogénèse mesurée par marquage à la tétracycline. Ce travail nous montre que pour maintenir et a fortiori obtenir de l'os cordialisé, il fallait un apport sanguin conséquent. Cette technique de l'inclusion d'un pédicule nourricier a été souvent développée, y compris pour des supports de bêta-TCP ensemencés par des cellules souches autologues, toujours chez le lapin [21], retrouvant toujours une ostéogénèse significativement plus importante avec l'inclusion d'un pédicule dans le greffon. Ces travaux très prometteurs nous obligent, néanmoins, à utiliser un pédicule nourricier dans sa totalité, tout au moins dans un premier temps, associé à un biomatériau, un os autologue ou une matrice osseuse déprotéinisée [22].

Intuitivement, on appréhende aisément la nécessité de maîtriser l'ingénierie du tissu vasculaire dans son ensemble, avec les capillaires mais aussi les artères et les veines, sans oublier les lymphatiques. Cela est nécessaire pour permettre la suppléance des gros volumes de tissus issus de l'ingénierie. Si nous prenons en compte les notions de l'embryologie, nous constatons que le réseau vasculaire se développe immédiatement, par angiogénèse et vasculogénèse, au rythme de croissance des tissus [5]. Il apparaît donc essentiel de mimer ce processus au cours de l'ingénierie tissulaire si nous voulons obtenir des volumes importants.

Induction d'un réseau vasculaire en ingénierie tissulaire

Le scaffold

Le développement de capillaires et microvaisseaux au sein des *scaffolds* devient donc un nouveau défi au niveau des biomatériaux eux-mêmes, qui ne doivent plus avoir une simple porosité interconnectée, mais un arrangement avec des microcanaux [23] qui faciliteront, le développement des cellules endothéliales.

Les signaux

De plus, au sein de ces *scaffolds* adaptés, l'utilisation de signaux biologiques se rencontre de plus en plus fréquemment (*vascular endothelial growth factor* [VEGF], *basic fibro-*

blast growth factor [bFGF], *platelet-derived growth factor* [PDGF] [6]). Nous retrouvons également des signaux chimiques ou biomimétiques [24], mais également des signaux biomécaniques du *scaffold* [5,8] et enfin, la culture en flux pulsé [25] qui miment les conditions physiologiques de perfusion des organes et induisent le réseau vasculaire.

Les cocultures cellulaires

L'enjeu des co-cultures cellulaires associant les ostéoblastes et les cellules endothéliales devient primordial dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse. Il faut aboutir à une co-culture vraie et pas une compétition, donc les conditions de culture seront déterminantes [26].

Pour faciliter la culture des cellules ostéoblastiques, le *scaffold* phosphocalcique est largement répandu, pour ce qui est des cellules endothéliales. Le *scaffold* constitué d'un microréseau de fibroïne de soie semble très prometteur [27] et se révèle efficace pour réaliser une interconnexion avec le réseau vasculaire du receveur [28].

Le biomimétisme

Nous aboutissons finalement à la notion du biomimétisme qui nous impose de créer un *scaffold* mimant la matrice extracellulaire du tissu que nous cherchons à recréer et qui induira la différenciation et la croissance des cellules que nous voulons obtenir (ostéoblastes et cellules endothéliales). Le concept de biomimétisme réunit trois impératifs inspirés de l'étude de la matrice extracellulaire [29] :

- en premier lieu, les propriétés physiques de l'environnement extracellulaire avec sa rigidité, son élasticité et donc les signaux physiques qui seront transmis aux cellules. Ce point rejoint l'intérêt de la stimulation par ultrasons pulsés de faible intensité ou *low intensity pulsed ultra-sound* (Lipus) dans les cultures cellulaires ostéoblastiques [30] ou encore la notion de bioréacteurs de type *mechano-active transduction and evaluation bioreactor* (Mate) dans laquelle le monitoring et l'application de forces mécaniques est mis en avant [31] ;
- en second lieu, les signaux chimiques et biochimiques [32], avec en tête de liste les biomolécules [33], mais aussi les séquences peptidiques des protéines présentes dans la matrice extracellulaire ;
- en troisième et dernier lieu, le contrôle de la micro- et de la nano-dimension du *scaffold*, avec la porosité, l'interconnexion [34] et la forme des sites où vont s'attacher les cellules pour se développer.

Il y a sur ce segment du biomimétisme un univers complet de notions fondamentales et de champs d'application afin de pouvoir recréer un support idéal pour les différents types d'ingénierie tissulaire.

Les travaux fondamentaux s'orientent, d'une part, sur le développement des différentes techniques de biomimétisme qui favorisent la co-culture des ostéoblastes et des cellules endothéliales, et d'autre part, sur la caractérisation de la

néovascularisation, par le biais de la microtomographie et la reconstruction tridimensionnelle [35].

Applications cliniques de l'ingénierie tissulaire osseuse

L'ingénierie tissulaire a pour but de nous affranchir des prélèvements osseux autologues. La meilleure tribune qui valide les avancées en termes d'ingénierie tissulaire est la clinique, en somme l'application des travaux fondamentaux selon leur dénomination translationnelle, très chère aux décideurs et investisseurs en matière de recherche.

Régénération osseuse guidée

La régénération tissulaire osseuse

Il s'agit d'un défi médical, technique et économique. D'après Nyman et al. [36] et Gottlow et al. [37] : « la régénération guidée d'un tissu spécifique est acquise, lorsque les cellules ayant la possibilité de régénérer ce type de tissu ont pu coloniser le défaut au cours du processus de cicatrisation ». Plusieurs stratégies ont été élaborées et sont actuellement en cours de développement. Nous verrons les techniques de régénération osseuse guidée (ROG) par membranes et par biomolécules.

On peut définir ainsi les trois stratégies de régénération tissulaire :

- régénération tissulaire in situ : la régénération tissulaire in situ vise à stimuler certains types cellulaires par l'utilisation de différents supports ou signaux. Cette stimulation doit aboutir à une régénération tissulaire localisée et spécifique. Le développement et l'utilisation des membranes et des biomolécules (facteurs de croissance) répond à ces objectifs. Les *bone morphogenetic protein* (BMP) ont fait l'objet de nombreuses investigations ;
- apport sur site de cellules autologues : ces cellules sont fraîchement prélevées et sélectionnées ; sinon elles sont cultivées au préalable. L'apport sur site de cellules autologues se fait, directement, ou par le biais d'un support (« matrice » ou *scaffold*) ;
- apport sur site de structure tissulaire tridimensionnelle réalisée in vitro : l'apport d'une structure tissulaire tridimensionnelle répond à l'utilisation combinée d'un support, de cellules progénitrices ou différenciées et de signaux physicochimiques.

Utilisation des membranes

Principe des membranes

Le principe des membranes repose sur la création d'un espace clos et hermétique autour d'un défaut afin de permettre la régénération par un tissu donné. L'utilisation de membranes dans la régénération osseuse vise à exclure du défaut osseux

toute population cellulaire non ostéogénique. L'espace ménagé par la membrane est en relation avec l'os « parent », afin de permettre une colonisation et une réparation osseuse, conjointement au développement de sa vascularisation. Le défaut est colonisé par des cellules ostéoprogénitrices, sans interférences des tissus mous alentour [38]. Dahlin et al. [39] ont rapporté le concept d'utilisation de membranes dans la ROG. Les membranes sont utilisées depuis plus de 20 ans en régénération osseuse [40], mais principalement au niveau alvéolaire et péri-implantaire, ou encore calvarial.

Descriptif des membranes

Karring et al. définissent les caractéristiques d'une membrane [41] : biocompatibilité, étanchéité cellulaire, maniabilité, capacité à créer et maintenir un espace :

- membranes non résorbables : l'essor de l'utilisation de la technique des membranes a permis le développement de membranes résorbables et non résorbables. La première membrane utilisée avec succès en ROG était en polytétrafluoroéthylène expansé (e-PTFE). Il s'agissait d'une membrane polymérique, non résorbable. Elle n'entraîne pas de réactions immunologiques de rejet [42]. Son utilisation impose un second temps-opératoire pour la dépose chirurgicale. Elle présente un risque d'exposition et impose un retrait prématuré.
- membranes résorbables : l'utilisation de membranes résorbables évite un second temps chirurgical. Plusieurs matériaux (collagène I, acide polylactique et acide polygalactique) ont été essayés en ROG avec des succès variables [43]. Sa résorption altère son rôle de barrière et peut potentiellement interférer avec le processus de régénération osseuse [40].

La plus ancienne des membranes résorbables et la plus connue étant la membrane de *platelet rich fibroblast* (PRF) obtenue par centrifugation du sang périphérique, durant 12 minutes dans un tube de 9 ml [44], largement utilisée dans la couverture des expositions osseuses alvéolaires ou implantaire, avec ou sans greffes. Ce substrat apparaît également intéressant comme support de culture cellulaire [45], y compris avec des cellules souches d'origine dentaire [46]. Cette nouvelle application mérite d'être explorée en raison du caractère peu invasif de son obtention. Nous pouvons imaginer que son intégration aux techniques de *bioprinting* puisse également se faire.

Indications et utilisation des membranes

L'utilisation des membranes dans la sphère maxillofaciale a été largement documentée. De nombreuses études animales ont porté sur le comblement, avec succès, de défauts mandibulaires et maxillaires lors de l'utilisation de membranes résorbables et non résorbables [39]. Donos et al. [47] ont utilisé des membranes pour le comblement

de défauts crâniens chez le rat. Plusieurs études ont porté sur le potentiel de néo-ostéogénèse des membranes seules [48] ou en association (grille de titane et e-PTFE) [49].

Les membranes sont fréquemment utilisées en association avec des greffes osseuses. L'utilisation de membranes seules ou lors de greffes osseuses permet de réduire la perte de volume d'os alvéolaire après avulsion [40]. Ce concept sera repris plus tard dans le cadre de la régénération osseuse potentialisée.

Buser et al. [50] ont rapporté la possibilité d'augmentation de volume de crêtes alvéolaires à visée pré-implantaire. Simion et al. [51] rapportent l'utilisation de membranes résorbables et non résorbables chez l'humain, lors de la mise en place d'implants après avulsion (*one-step*). Les procédures de ROG par membranes ont été employées, avec succès, afin de traiter les fenestrations osseuses lors de la pose d'implant. Enfin, le traitement d'une insuffisance verticale lors de la mise en place d'implant, par l'utilisation combinée de membrane (e-PTFE), autogreffe et xéngreffe osseuse a été étudié par Simion et al. [52].

Finalement, l'utilisation de membranes a montré son efficacité dans le traitement des défauts osseux péri-implantaires et le maintien de l'os alvéolaire après avulsion, seules, ou en association avec des greffes osseuses, dont l'efficacité en cas d'insuffisance transversale ou verticale et implantation, présente des taux de réussite variable [40]. La membrane permet de confiner un volume au sein duquel les conditions sont propices pour la régénération osseuse : peu de tensions mécaniques ou d'écrasement, forte concentration de biomolécules, forte cellularité et bonne vascularisation. Il s'agit ici de l'ancêtre de l'endocultivation que nous développerons après.

Régénération osseuse potentialisée

Sur le modèle de la ROG, nous avons vu se développer des techniques de régénération de l'os basal mandibulaire dans des conditions favorables du point de vue vasculaire. Par exemple, le cas clinique de Lee et al. [53] sur un hémangiome centromandibulaire droit, traité par amputation interruptrice de la mandibule (parasymphise gauche à la région sous-condylienne droite) et remplacement initial par une mégaplaque. Le fragment osseux retiré a été entièrement décortiqué et congelé pour ne garder que la trame corticale. Sept mois plus tard, après culture cellulaire issue de cellules de moelle osseuse, cette trame osseuse autologue et sur mesure a été réimplantée en ajoutant les cellules souches. La reconstruction mandibulaire a été parfaitement obtenue au niveau de l'os basal et une distraction verticale a été réalisée sur l'os régénéré pour permettre l'insertion d'implants dentaires. Ce cas exceptionnel démontre une fois de plus l'intérêt d'un tissu receveur parfaitement vascularisé et des *scaffolds* sur mesure avec une tenue biomécanique équivalente à la portion osseuse à remplacer.

Un autre exemple de reconstruction mandibulaire a été publié par Herford [54], pour la reconstruction de défauts mandibulaires interrupteurs après exérèse d'améloblastomes. Dans les cas exposés, la technique associait une exérèse interruptrice, la mise en place d'une mégaplaque pour ponter la perte de substance de la basilaire, la mise en place d'une matrice osseuse déminéralisée avec l'ajout de rhBMP2, le tout coiffé d'une grille de titane pour maintenir les tissus mous. Dans un cas, des implants dentaires ont été mis en place, dans les deux cas, la mégaplaque a été conservée. Ici encore, la possibilité de mettre en œuvre ces applications cliniques est, tout à fait, réaliste en pratique courante pour éviter l'utilisation d'un lambeau libre osseux classiquement proposé. Lorsque les tissus mous périmandibulaires et, notamment, le périoste sont conservés dans un terrain bien vascularisé, chez un patient jeune en bonne santé, il est tout à fait envisageable d'avoir recours à ces techniques. En terrain radique ou carcinologique, la problématique est toute autre, mais certains cas cliniques d'utilisation de BMP ont été rapportés [55].

Les techniques de culture cellulaire et de vascularisation

Les moyens techniques

Le nouveau challenge de la culture cellulaire est d'apporter un grand volume osseux parfaitement perfusé et « anastomosable » au tissu receveur, en somme créer in vitro un lambeau libre osseux à l'image de ceux que nous utilisons régulièrement, mais sans la morbidité du prélèvement. Avant de pouvoir réaliser cette prouesse, la culture en bioréacteur perfectionnés, avec des techniques de biomimétisme sur des biomatériaux activés est nécessaire, faisant aussi appel au *bioprinting*. De nombreux travaux fondamentaux sont encore à conduire avant d'aboutir à l'application de ces techniques, car il faut maîtriser le *scaffold*, faire proliférer les cellules ostéoprogénitrices, inclure le réseau capillaire, induire la membrane périostée et finir par développer le réseau vasculaire d'amont et d'aval, parfaitement connecté au réseau capillaire. Nous sommes très loin de la « simple » culture de cellules souches différenciées en cellules ostéoblastiques sous l'influence des molécules bioactives et des signaux biomécaniques.

Les illustrations pratiques

La culture cellulaire sur support peut se faire en utilisant des techniques statiques (diffusion) ou dynamiques (perfusion ; rotation au sein d'un bioréacteur) comme nous l'avons vu précédemment. On peut aussi mentionner la réalisation de supports tridimensionnels, comprenant des microcanaux, qui permettent la diffusion des nutriments et cellules [56]. L'utilisation de bioréacteurs permet une répartition homogène de la population cellulaire sur le support [57] avec la maîtrise et le suivi des paramètres de culture. La reproductibilité, le gain de productivité que leur utilisation engendre sont indéniables.

Il est possible d'améliorer la fonctionnalisation des supports par adjonction de molécules. Ces molécules peuvent favoriser l'adhésion et guider la colonisation du support par les cellules [56]. Des procédés de libération prolongée de molécules permettant de guider la différenciation ont été réalisés. Ainsi, Yang et al. [58] ont démontré une meilleure différenciation en cellules ostéoprogénitrices dans un support de *poly lactic acid* (PLA), parsemé de facteur de croissance osseux (BMP2).

Kokemueller et al. [59] ont décrit la reconstruction partielle d'une hémimandibule au moyen de cylindres de β -TCP, comblés de moelle osseuse issue de crête iliaque. Le lambeau préfabriqué prélevé a été utilisé à la manière d'une greffe osseuse autologue après avoir été conformé par piezochirurgie. Yuan et al. [60] ont démontré la possibilité de régénération d'un défaut osseux mandibulaire segmentaire chez l'animal par l'utilisation combinée de β -TCP et BMSCs. Zhou et al. [61] ont rapporté avec succès l'utilisation de β -TCP, co-cultivé avec des BMSCs et des cellules endothéliales dérivées des BMSCs dans la réparation d'un défaut segmentaire osseux chez le lapin. Cette dernière publication permet d'envisager la régénération osseuse dans les cas de défauts osseux importants. Espitalier et al. [62] ont proposé de comparer la régénération osseuse en terrain irradié chez le lapin, en utilisant, d'une part, l'association *macroporous biphasic calcium phosphate* (MBCP) + MSCs (issus du tissu adipeux ou de la moelle osseuse) et, d'autre part, MBCP + moelle osseuse totale. Cette dernière association donne les meilleurs résultats en terrain radique. L'ingénierie tissulaire osseuse en terrain radique reste un défi, en particulier en raison de l'hypovascularisation du site receveur et de la grande taille de la zone atteinte. C'est justement le terrain radique qui permet de prouver le potentiel et la vitalité du tissu transféré.

L'endocultivation

Un autre procédé d'ingénierie tissulaire, utilisé avec succès, est « l'endocultivation ». Il consiste à utiliser le corps du patient comme bioréacteur ; à l'image de la distraction ostéogénique, on arrive à s'affranchir du bioréacteur in vitro et tirer avantage de la régulation biologique humaine. Cette pratique vise à pallier certaines limitations techniques du procédé standard d'ingénierie tissulaire dans les bioréacteurs in vitro. La prévascularisation de biomatériaux de grand volume reste source de difficultés. L'utilisation du procédé standard d'ingénierie tissulaire n'est pas applicable en clinique pour des défauts osseux de trop grande taille, ni en terrain radique. On engendre une formation de tissu osseux en situation hétérotopique, classiquement dans un tissu musculaire ou un fascia, en créant un volume et une forme adaptés au défaut à reconstruire, et surtout dans une situation anatomique connue pour être maîtrisée du point de vue microchirurgical et vasculaire.

On réalise alors la préfabrication d'un lambeau en utilisant les composants nécessaires à l'ingénierie tissulaire. Warnke et al.,

en 2004 [63], ont été les premiers à présenter cette technique au niveau mandibulaire. Ce lambeau préfabriqué est placé dans le corps du patient (loge musculaire). L'objectif de cette manœuvre est de permettre la vascularisation du lambeau préfabriqué. La vitalité et la qualité de la vascularisation sont vérifiées par imagerie (angioscanner ou scintigraphie osseuse). Enfin, si la vascularisation est efficace, le lambeau est transféré de sa niche musculaire jusqu'au site de reconstruction. Selon les équipes et la vascularisation du lambeau, une anastomose vasculaire microchirurgicale est réalisée. De son côté, Héliotis et al., en 2006 [64], ont tenté l'endocultivation d'une hémimandibule en hydroxy-apatite préformée et mise en nourrice sous le *pectoralis major* du patient potentialisée par de la BMP7. Après trois mois d'endocultivation, le greffon a été transféré en pédiculé, puis sevré au bout de quatre semaines. Malheureusement, la tenue n'aura été que de cinq mois dans un terrain radique et donc vasculairement hostile, en dépit du caractère initialement bien vascularisé du lambeau. L'autonomie vasculaire et la qualité de la vascularisation sont donc primordiales pour les reconstructions maxillofaciales en terrain hostile.

Warnke et al. ont apporté la preuve de la vitalité de son procédé novateur [65], mais sans pouvoir retirer la grille de titane maintenant le *scaffold* ni pouvoir disposer des implants dentaires en raison du décès de son patient à 15 mois. Il n'y a donc pas eu de mise en charge véritable permettant de vérifier la résistance de l'os sans soutien par le titane [66], mais des études histologiques de l'os généré par ce procédé ont montré une bonne qualité microscopique et une résistance mécanique similaire à l'os mandibulaire natif en compression (os spongieux) chez le porc miniature [67]. Pour autant, l'os généré dans un muscle selon ce procédé hétérotopique ne semble pas avoir des propriétés mécaniques corticales mais au moins les propriétés de l'os trabéculaire. Bien qu'affranchis des contraintes du bioréacteur in vitro, la nécessité d'amplifier et d'accélérer le processus a obligé les équipes à retourner à la paille pour faire avancer les applications cliniques et aboutir, non plus au concept du tissu osseux issu de l'ingénierie tissulaire, mais véritablement à un « organe osseux » avec ses qualités vasculaires. Une fois le problème de la vascularisation autonome du tissu issu de l'ingénierie résolu, il est également nécessaire de forcer la production osseuse dans la situation anatomique hétérotopique. Ainsi, l'addition de signaux biochimiques durant cette endocultivation devient une nouvelle voie de recherche [68] qui visera à corticaliser l'os obtenu et accélérer sa production.

Concernant la reconstruction du maxillaire, l'équipe de Suuronen [4] a décrit la reconstruction d'un maxillaire par endocultivation. Le support utilisé se composait de granules de β -TCP maintenues dans une grille de titane, en association avec des rhBMPs. Les cellules utilisées provenaient de cellules souches progénitrices d'origine adipocytaire. L'endocultivation a été réalisée au sein du *rectus abdominis* du patient et une anastomose vasculaire microchirurgicale a été réalisée

lors du transfert au niveau du maxillaire. Ces deux expérimentations humaines ont permis de toucher du doigt l'avenir des reconstructions des maxillaires par l'ingénierie tissulaire. Malheureusement, il faut encore dépendre du prélèvement d'un lambeau libre, mais non osseux dans la mesure où la création de l'os est hétérotopique, au sein d'un muscle utilisé couramment comme lambeau libre. D'autres études sur le lapin, cette fois-ci, permettent d'envisager l'épiploon comme receveur de l'os néoformé avant d'être éventuellement transférable [69].

Limites techniques de l'ingénierie tissulaire osseuse

La notion d'organe osseux versus tissus osseux

Finalement, l'évolution de l'ingénierie tissulaire s'est faite très vite, dans un volume de connaissance et de maîtrise technique excessivement vaste, où l'ensemble des procédés ont été associés entre eux.

On voit ainsi apparaître la notion de *bioprinting in vivo* [70] chez la souris, avec la reconstruction de petits défauts calvaires. On admire les lambeaux libres musculaires avec culture osseuse hétérotopique selon les procédés d'endocultivation [4,63], ainsi que les régénérations osseuses guidées, notablement améliorées par les biomolécules et les cultures cellulaires [53,54].

Pour autant, la maîtrise *in vivo* de la vascularisation est loin d'être obtenue avant de pouvoir hisser un tissu issu de l'ingénierie au rang d'un lambeau libre osseux correspondant à un organe autonome. Les travaux fondamentaux progressent en associant les différentes cellules souches, les différents supports, les différents signaux biologiques et biomécaniques.

L'association de techniques d'ingénierie tissulaire parvient effectivement à réaliser un tissu osseux, mais nous n'arrivons pas encore à générer l'organe osseux en lui-même. En particulier, le périoste, le tissu sanguin et immunitaire, la moelle osseuse ne sont pas générés par l'ingénierie tissulaire.

À l'image d'une active coopération entre les chercheurs en sciences fondamentales, nous voyons la nécessité d'une intense collaboration entre les équipes pilotant les différentes thématiques d'ingénierie tissulaire, sous forme de « centres de régénération » qui permettent de regrouper les équipes travaillant sur le tissu osseux, cartilagineux, vasculaire, cardiovasculaire, neurologique etc... Il s'agit du seul mode organisationnel qui permette d'échanger les informations de chaque thématique et faire progresser le socle de connaissances vers la production d'organes et non plus de simples tissus.

L'importance du tissu hématopoïétique

La construction d'un lambeau libre osseux *in vitro*, donc dépourvu de morbidité, est une sorte de résumé de l'objectif

Organisation schématique du tissu osseux	Possibilités de l'ingénierie tissulaire osseuse
Trame phosphocalcique avec structure poreuse / corticale avec adhésion et ostéoinduction Réseau de collagène	Biomatériau, os déprotéinisé Biomimétisme, nanostructure Matrice osseuse déminéralisée
Matrice extracellulaire Biomolécules régulatrices	Non générée Origine : recombinante, <i>in situ</i> génie génétique culture cellulaire
Cellules osseuses Adipocytes Cellules endothéliales Moelle osseuse Sang Système immunitaire	Culture cellulaire Co-culture ? Co-culture + Bioréacteur à flux Non générée Non générée (milieu de culture) Non généré
Vaisseaux sanguins macroscopique Réseau capillaire Périoste	Prélèvement local Non générée (Endocultivation) Non générée

Figure 4. Schéma des techniques d'ingénierie tissulaire développées pour répondre au mimétisme technologique du tissu osseux.

à atteindre dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse maxillofaciale, mais qui n'est malheureusement pas encore dans nos mains.

Il faudrait, en effet, au préalable recréer le tissu hématopoïétique avec un système d'oxygénation et une circulation, et surtout un centre de régulation cellulaire qui induise la multiplication, la migration, la différenciation et l'organisation tridimensionnelle des cellules, sachant qu'à ce stade, le *scaffold* serait même inutile, puisqu'il pourrait être induit par le développement tissulaire.

À l'heure actuelle, nous avons des *scaffolds* de très bonne qualité, nous produisons des biomolécules actives à la fois sur le tissu osseux mais aussi vasculaire, les techniques de culture cellulaire s'affinent et permettent d'associer plusieurs types cellulaires. Pour autant, le milieu de culture n'est pas du sang, ne contient pas de système immunitaire pour se défendre contre les bactéries et agents pathogènes, et enfin le réseau capillaire et vasculaire n'est pas du tout développé, et seule l'endocultivation [4,63,65,66] ou la dérivation des pédicules vasculaires de l'hôte permettent de contourner ce problème [20,21] (fig. 4).

L'origine des tissus

Si nous revenons à nos notions d'embryologie, on se remémore la date des premiers battements cardiaques à trois semaines, alors que l'embryon ne fait que 5 mm. Déjà pour ce volume tissulaire, une perfusion est « naturellement » établie afin d'assurer sa croissance. Par ailleurs, il n'y a pas de *scaffold* pour l'édification osseuse, mais des cellules souches [6], qui se différencieront lors de la morphogenèse et de l'organogenèse pour former le tissu osseux si cher à notre spécialité.

Il y a donc des signaux cellulaires aboutissant à ce résultat, dont l'existence est prouvée depuis les années 1920 avec les travaux de Hans Spemann [71], qui a établi les centres de

régulation qui induisent l'organisation des cellules en tissus et organes. Nous devons impérativement mieux les connaître afin de les appliquer et répondre à notre demande clinique en ingénierie tissulaire osseuse.

D'un point de vue pragmatique, deux axes principaux vont se développer dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse : l'axe de la culture sur *scaffold* avec prévascularisation, d'un côté, et l'axe de régulation cellulaire de l'autre utilisant uniquement les cellules souches qui aboutiront à la genèse de tissu et d'organes osseux. Le premier axe trouvera plus rapidement des applications cliniques mais qui seront moins abouties que celles issues de la régulation cellulaire.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Raoul G, Ruhin B, Briki S, Lauwers L, Haurou PG, Capet JP, et al. Microsurgical reconstruction of the jaw with fibular grafts and implants. *J Craniofac Surg* 2009;20:2105–17.
- [2] Ferri J, Lauwers L, Jeblaoui Y, Genay A, Raoul G. Le Fort I osteotomy and calvarial bone grafting for dental implants. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2010;111:63–7.
- [3] Meyer U, Handschel J. Evidence-based application in tissue engineering and regenerative medicine. In: Meyer U, Meyer T, Handschel J, Wiesmann HP, editors. *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*. Berlin: Springer; 2009. p. 801–13.
- [4] Mesimaki K, Lindroos B, Tornwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009;38:201–9.
- [5] Rivron NC, Liu JJ, Rouwkema J, de BJ, van Blitterswijk CA. Engineering vascularised tissues in vitro. *Eur Cell Mater* 2008;15:27–40.
- [6] Bueno EM, Glowacki J. Biologic foundations for skeletal tissue engineering. *Synth Lect Tissue Eng* 2011;3:1–220.
- [7] Ferri J, Dujoncquoy JP, Carneiro JM, Raoul G. Maxillary reconstruction to enable implant insertion: a retrospective study of 181 patients. *Head Face Med* 2008;4:31.
- [8] Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2008;26:434–41.
- [9] Xie Y, Hardouin P, Zhu Z, Tang T, Dai K, Lu J. Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold. *Tissue Eng* 2006;12:3535–43.
- [10] Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2009;15:353–70.
- [11] Chen FM, Chen R, Wang XJ, Sun HH, Wu ZF. In vitro cellular responses to scaffolds containing two microencapsulated growth factors. *Biomaterials* 2009;30:5215–24.
- [12] Hoang Thi TH, Chai F, Lepretre S, Blanchemain N, Martel B, Siepmann F, et al. Bone implants modified with cyclodextrin: study of drug release in bulk fluid and into agarose gel. *Int J Pharm* 2010;400:74–85.
- [13] Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C, et al. Future of local bone regeneration – Protein versus gene therapy. *J Craniofac Surg* 2011;39:54–64.
- [14] Yang L, Zhang Y, Dong R, Peng L, Liu X, Wang Y, et al. Effects of adenoviral-mediated coexpression of bone morphogenetic protein-7 and insulin-like growth factor-1 on human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 2010;45:532–40.
- [15] Arano T, Sato T, Matsuzaka K, Ikada Y, Yoshinari M. Osteoblastic cell proliferation with uniform distribution in a large scaffold using radial-flow bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:1387–98.
- [16] Yeatts AB, Fisher JP. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 2011;48:171–81.
- [17] Yeatts AB, Fisher JP. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:337–48.
- [18] Grayson WL, Frohlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3299–304.
- [19] Lovett M, Rockwood D, Baryshyan A, Kaplan DL. Simple modular bioreactors for tissue engineering: a system for characterization of oxygen gradients, human mesenchymal stem cell differentiation, and prevascularization. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:1565–73.
- [20] Yao Y, Hua C, Tang X, Wang Y, Zhang F, Xiang Z. Angiogenesis and osteogenesis of non-vascularised autogenous bone graft with arterial pedicle implantation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63:467–73.
- [21] Wang L, Fan H, Zhang ZY, Lou AJ, Pei GX, Jiang S, et al. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized beta-tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2010;31:9452–61.
- [22] Zhao M, Zhou J, Li X, Fang T, Dai W, Yin W, et al. Repair of bone defect with vascularized tissue engineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits. *Microsurgery* 2011;31:130–7.
- [23] Fiddes LK, Raz N, Srigunapalan S, Tumarkan E, Simmons CA, Wheeler AR, et al. A circular cross-section PDMS microfluidics system for replication of cardiovascular flow conditions. *Biomaterials* 2010;31:3459–64.
- [24] Fu RH, Wang YC, Huang CM, Kang YH, Tsai CH, et al. Differentiation of stem cells: strategies for modifying surface biomaterials. *Cell Transplant* 2011;20:37–47.
- [25] Riha GM, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Ann Biomed Eng* 2005;33:772–9.
- [26] Ma J, van den Beucken JJ, Yang F, Both SK, Cui FZ, Pan J, et al. Coculture of osteoblasts and endothelial cells: optimization of culture medium and cell ratio. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:349–57.
- [27] Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 2007;28:3965–76.
- [28] Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* 2010;31:6959–67.
- [29] von der MK, Park J, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 2010;339:131–53.

- [30] Gleizal A, Lavandier B, Paris M, Béra JC. Intérêt des ultrasons pulsés de faible intensité dans la stimulation de la régénération osseuse. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2011;112:1-7 [Epub ahead of print].
- [31] Lujan TJ, Wirtz KM, Bahney CS, Madey SM, Johnstone B, Bottlang M. A novel bioreactor for the dynamic stimulation and mechanical evaluation of multiple tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:367-74.
- [32] Ripamonti U. Biomimetism, biomimetic matrices and the induction of bone formation. *J Cell Mol Med* 2009;13:2953-72.
- [33] Cordonnier T, Langonne A, Sohier J, Layrolle P, Rosset P, Sensebe L, et al. Consistent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with bone morphogenetic protein 4 and low serum. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:249-59.
- [34] Tang Y, Wong C, Wang H, Sutti A, Kirkland M, Wang X, et al. Three-dimensional tissue scaffolds from interbonded poly(epsilon-caprolactone) fibrous matrices with controlled porosity. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:209-18.
- [35] Arkudas A, Beier JP, Prymachuk G, Hoereth T, Bleiziffer O, Polykandriotis E, et al. Automatic quantitative microcomputed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:1503-14.
- [36] Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982;9:290-6.
- [37] Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11:494-503.
- [38] Meyer U, Wiesmann HP, Handschel J, Kubler NR. Bone tissue engineering. In: Meyer U, Meyer T, Handschel J, Wiesmann HP, editors. *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*. Berlin: Springer; 2009. p. 211-32.
- [39] Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672-6.
- [40] Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:567-76.
- [41] Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration – animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993;1:26-35.
- [42] Becmeur F, Geiss S, Laustriat S, Bientz J, Marcellin L, Sauvage P. History of Teflon. *Eur Urol* 1990;17:299-300.
- [43] Brunel G, Benque E, Elharar F, Sansac C, Duffort JF, Barthet P, et al. Guided bone regeneration for immediate non-submerged implant placement using bioabsorbable materials in Beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:303-12.
- [44] Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, Del CM, Charrier JB. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol* 2010;55:185-94.
- [45] Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Acil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:543-9.
- [46] Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant* 2010;5:1-47 [Epub ahead of print].
- [47] Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:101-11.
- [48] Kostopoulos L, Karring T, Uruguchi R. Formation of jawbone tuberosities by guided tissue regeneration. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 1994;5:245-53.
- [49] Hjørtting-Hansen E, Helbo M, Aaboe M, Gotfredsen K, Pinholt EM. Osseointegration of subperiosteal implant via guided tissue regeneration. A pilot study. *Clin Oral Implants Res* 1995;6:149-54.
- [50] Buser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:22-32.
- [51] Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:735-42.
- [52] Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylene membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio Oss). *Clin Oral Implants Res* 2007;18:620-9.
- [53] Lee J, Sung HM, Jang JD, Park YW, Min SK, Kim EC. Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resected autogenous bone graft in central hemangioma. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:188-94.
- [54] Herford AS. rhBMP-2 as an option for reconstructing mandibular continuity defects. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:2679-84.
- [55] Spagnoli DB. The application of recombinant human bone morphogenetic protein on adsorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) to reconstruction of maxillofacial bone defects. In: Vukicevic S, Sampath KT, editors. *Bone morphogenetic proteins: from local to systemic therapeutics*. Basel: Birkhauser; 2008. p. 43-70.
- [56] Evans ND, Gentleman E, Polak JM. Scaffolds for stems cells. *Mater Today* 2006;9:26-33.
- [57] Martin I, Riboldi SA, Jakob M, Wendt D. Snapshot: bioreactors systems in tissue engineering (TE) and regenerative medicine (RM). *Biomaterials* 2010;31:3114-5.
- [58] Yang XB, Whitaker MJ, Sebald W, Clarke N, Howdle SM, Shakesheff KM, et al. Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds. *Tissue Eng* 2004;10:1037-45.
- [59] Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:379-87.
- [60] Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2007;28:1005-13.
- [61] Zhou J, Lin H, Fang T, Li X, Dai W, Uemura T, et al. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone. *Biomaterials* 2010;31:1171-9.
- [62] Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials* 2009;30:763-9.
- [63] Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364:766-70.

- [64] Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiroidis E, di SL. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:265–9.
- [65] Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M, et al. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 2006;27:3163–7.
- [66] Gronthos S. Reconstruction of human mandible by tissue engineering. *Lancet* 2004;364:735–6.
- [67] Warnke PH, Springer IN, Acil Y, Julga G, Wiltfang J, Ludwig K, et al. The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials* 2006;27:1081–7.
- [68] Warnke PH, Bolte H, Schunemann K, Nitsche T, Sivananthan S, Sherry E, et al. Endocultivation: does delayed application of BMP improve intramuscular heterotopic bone formation? *J Craniomaxillofac Surg* 2010;38:54–9.
- [69] Kamei Y, Toriyama K, Takada T, Yagi S. Tissue-engineering bone from omentum. *Nagoya J Med Sci* 2010;72:111–7.
- [70] Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, Guillotin B, Miraux S, Amedee J, et al. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication* 2010;2:014101.
- [71] Lagercrantz H. Hans Spemann (1869–1941): discoverer of the neuronal organizer. *Acta Paediatr* 2006;95:386–7.