



**HAL**  
open science

## Préconditionnement Laser en site osseux membraneux.

Sophie Desmons

► **To cite this version:**

Sophie Desmons. Préconditionnement Laser en site osseux membraneux.. Sciences du Vivant [q-bio].  
Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00331277

**HAL Id: tel-00331277**

**<https://theses.hal.science/tel-00331277>**

Submitted on 16 Oct 2008

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

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

UNIVERSITE DE LILLE II  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

---

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Spécialité : ODONTOLOGIE

---

Présentée et soutenue le Mardi 16 Septembre 2008

par

**Sophie DESMONS**

---

**Préconditionnement Laser en site osseux membraneux.**

---

Directeurs de Thèse : S. MORDON, G.PENEL

JURY :

Monsieur le Professeur Bertrand DEVAUX,  
Monsieur le Professeur Pierre-Hubert DUPAS,  
Madame le Docteur Geneviève BOURG-HECKLY,  
Monsieur le Docteur Jean-Christophe FRICAIN,  
Monsieur le Docteur Serge MORDON,  
Monsieur le Docteur Guillaume PENEL.

***A mes Maîtres et Juges,***

## **Monsieur le Professeur Bertrand DEVAUX**

- Professeur des Universités et Praticien Hospitalier
- Président de la Société Française des Lasers Médicaux
- Service de Neurochirurgie, C.H. Sainte-Anne, Paris

*Vous avez accepté de présider le jury de cette thèse et d'en être le rapporteur*

*Sensible à l'honneur que vous me faites de juger ce travail, Soyez assuré, Monsieur le Professeur, de mes sincères remerciements et de mon respect le plus profond.*

## **Monsieur le Professeur Pierre-Hubert DUPAS**

- Professeur des Universités et Praticien Hospitalier.
- Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Lille.

*Durant mes études, vous m'avez donné l'envie et la possibilité d'aller toujours plus loin. Depuis quelques années, j'ai la grande joie de travailler à vos côtés et l'immense honneur de profiter de votre grande expérience clinique dans une ambiance chaleureuse et quelque peu survoltée qui vous est propre. Vos qualités humaines et votre passion pour votre métier sont des exemples au quotidien.*

*Pour votre soutien sans faille, votre enthousiasme contagieux et pour tout le reste, je vous remercie très sincèrement.*

**Monsieur le Docteur Jean Christophe FRICAIN**

- Maître de Conférences des Universités et Praticien Hospitalier
- U577, Biomatériaux et réparation tissulaire,
- Faculté de Chirurgie Dentaire de Bordeaux

*Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à la correction de ce travail.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.*

## **Madame le Docteur Geneviève BOURG-HECKLY**

- Maître de Conférences des Universités
- BioMoCeTi CNRS UMR7033,
- Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.

*Avec spontanéité, vous avez accepté de siéger dans ce jury et je vous en remercie.*

*Veillez trouver ici l'assurance de mon profond respect et de toute ma gratitude.*

## **Monsieur le Docteur Serge MORDON**

- Directeur de Recherche
- INSERM U703 ; Institut de Technologie Médicale,
- Pavillon Vancostenobel, CHRU, Lille.

*Voilà plus de 3 ans que j'ai fait mes premiers pas dans la recherche à vos côtés. Votre enthousiasme et votre créativité m'ont permis de réaliser des choses dont je ne me serai jamais crue capable. Je vous remercie chaleureusement pour vos encouragements tout au long de la réalisation de ce travail. Grâce à vous, cette expérience aura été extrêmement enrichissante tant sur le plan professionnel que personnel.*

*Je vous remercie infiniment du temps que vous m'avez accordé et de la rigueur scientifique que vous m'avez patiemment inculquée.*

## Monsieur le Docteur Guillaume PENEL

- Maître de Conférences des Universités et Praticien Hospitalier
- EA 4032, Physiopathologie et thérapeutique des tissus calcifiés
- Faculté de Chirurgie Dentaire de Lille.

*Ce travail est l'aboutissement d'une longue aventure aux nombreux épisodes. De nos grandes discussions en passant par les interventions sur les animaux, tu m'as entraînée dans le monde de la Recherche en Chirurgie Dentaire : un véritable challenge... Plusieurs phrases philosophiques « d'auteurs contemporains régionaux et retraités » me viennent à l'esprit, mais*

*« Pour expliquer un brin de paille, il faut démonter tout l'univers. » R de Gourmont résume assez bien ce que je retiendrai.*

*Je te remercie d'avoir toujours soutenu et supporté mon côté pessimiste peut être un peu trop prononcé parfois je l'avoue.*

*A mes Parents,*

*A ma Famille,*

*A mes Amis,*

*A Théo,*

*Je suis ravie et fière d'être aussi bien entourée.  
Votre présence, votre confiance infaillible et vos  
encouragements permanents ont donné le jour à ce travail.  
Je vous le dédie aujourd'hui avec tout mon Amour.*

*Pour tout ce qui est derrière et tout ce qui se prépare :*

**MERCI**

Parce que « *La reconnaissance silencieuse ne sert à personne.* » *G. Bronwyn Stern*,  
une attention particulière aux bonnes âmes sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour:

Caroline DELFOSSE,

L'un des plus grand mérite de ce travail est de m'avoir permis de te rencontrer. Véritable coach, tu as toujours été présente pour écouter, corriger, diriger et soutenir dans les bons mais surtout dans les mauvais moments. Si cette thèse est l'aboutissement de notre travail, j'espère surtout qu'elle marque le point de départ d'une longue amitié.

Michal HEGER,

Scientific more than rigorous, your stubbornness is rivalled only by your kindness. In waiting our next gastronomic or scientific experiments: Thank you for all!

Guillaume FALGAYRAC,

Merci beaucoup pour la « hotline » efficace, patiente et avec une pointe d'accent du sud que tu as mis à ma disposition, c'est un plaisir de travailler avec toi.

Marie - Hélène VIEILLARD et Emmanuel BIVER,

Merci pour votre large contribution à l'ambiance chaleureuse et sympathique du labo. Il paraît que l'on ne va jamais aussi loin que quand on ne sait pas où l'on va, alors je vous souhaite bonne route !

Philippe ROCHON,

Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton investissement dans la réalisation de ce projet.

Bruno BUYS, Guy DHELIN et, Jean-Claude LESAGE

Votre soutien technique et moral durant ces années a participé à l'aboutissement de ce travail, je vous en suis très reconnaissante.

Marie Hélène GEVEART et Alexandre UNG,

Votre patience, votre motivation et quelques litres d'EDTA ont eu raison du challenge de l'immunomarquage sur tissu osseux. Je vous remercie pour l'obstination dont vous avez fait preuve quand je commençais à en manquer.

Arnold et Michel,

qui envers et contre tout prennent soin des animaux et des étudiants désemparés...

Thierry SARRAZIN,

Je tiens à vous remercier pour votre disponibilité et votre gentillesse qui ont rendu possible la mise en place du protocole de radiothérapie.

Patrick DEVOS et Julia SALLERON

qui ont eu l'immense tâche de me rendre les statistiques accessibles et compréhensibles (ou presque...)

Gérard LEROY,

Merci de défendre ce travail contre vents et marées depuis le premier jour. J'attends le prochain exposé de vos nouveaux grands concepts philosophiques avec toujours autant d'enthousiasme.

Je remercie également chaleureusement C. DELATTRE et CA. MAURAGE (service d'anatomopathologie CHRU de Lille) pour leurs conseils avisés en histologie osseuse, S. CATROS (laboratoire de Biomatériaux et de Réparation tissulaire, U577, Faculté de Chirurgie Dentaire de Bordeaux ) pour la réalisation de coupes histologiques incluses en résine, Y.BAILLEZ (Faculté de Chirurgie Dentaire de Lille) pour son support moral et logistique, Thomas HUBERT (U859 INSERM, thérapie cellulaire du diabète) pour le scanner, Benjamin WASSMER (Osyris, Hellemmes), pour la modélisation mathématique.

Ce travail a été réalisé en collaboration au sein de deux laboratoires :

- INSERM U703, Pavillon Vancostenobel, CHRU, 59037 Lille Cedex, France dirigé par S.MORDON PhD, Directeur de Recherche.
- EA 4032- IMPRT IFR 114, Faculté de Chirurgie Dentaire, CHRU, 59037 Lille Cedex, France, dirigé par G. PENEL, DDS, PhD.

Ce travail a bénéficié la bourse "ASLMS Student Research Grant" de l'American Society in Laser on Medicine and Surgery (ASLMS) en 2006 et en 2007, premier projet étudiant européen à recevoir cette bourse depuis la mise en place de ce type de financement par l'ASLMS.

Ce travail a obtenu le Prix « Basic Science Student/Research Award » lors du 28ème congrès de cette société qui a eu lieu du 3 au 6 avril 2008 à Kissimmee, Floride, USA.

Il a également fait l'objet de plusieurs publications dans des revues internationales à comité de lecture et communications lors de différents congrès scientifiques.

#### **PUBLICATIONS :**

1/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, B. Buys, G. Penel , S. Mordon.

**"Effect of a Laser irradiation on the vascularisation of safety and X-ray radiated bone"**

Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2007;1:5845-5848.

2/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, B. Buys, G. Penel, S. Mordon.

**"Laser preconditioning on calvarial bone before an X-ray radiation injury: preliminary *in vivo* study of the vascular response."**

Lasers Surg Med, 2008, 40 (1), p28-37

3/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, B. Buys, G. Falgayrac, G. Penel, S. Mordon.

**« Préconditionnement Laser en site osseux membraneux : Mise au point d'un modèle d'étude. »**

ITBM sous presse.

#### **COMMUNICATIONS:**

1/ C. Delfosse, S. Desmons , P. Rochon, G. Leroy, S. Mordon, G. Penel

**"Effects of differents irradiations on bone vascularization"**

50<sup>ème</sup> GIRSO, Palerme, 27-29 Avril 2006.

Abstract : Bulletin du GIRSO, avril 2006. Vol. 47, Suppl. 1, p18.

2/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, G. Leroy, G. Penel, S. Mordon.

« **Cicatrisation osseuse après préconditionnement laser : Etude préliminaire intravitale.** »

8<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, Lyon, 19 - 20 septembre 2006

3/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, G. Leroy, G. Penel, S. Mordon.

« **Cicatrisation osseuse après préconditionnement laser : Etude préliminaire intravitale.** »

Association Dentaire Française, Paris, le 22 novembre 2006.

4/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, G. Penel, S. Mordon

« **Laser preconditioning improves bone revascularization after X ray radiation: a preliminary in vivo study.** »

27<sup>ème</sup> Conférence annuelle ASLMS, Dallas, Texas, USA, 11-14 Avril 2007

5/ S. Desmons, C. Delfosse, G. Falgayrac, G. Penel, S. Mordon.

“**Laser preconditioning of calvarial bone prior to X ray radiation: in vivo vascular response.**”

28<sup>ème</sup> Conférence annuelle ASLMS, Kissimmee, Floride, USA, 2-6 Avril 2008.

### **POSTERS :**

1/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, G. Leroy, G. Penel, S. Mordon

“**Laser preconditioning on irradiated bone: a preliminary intravital study**”

16th Interdisciplinary Research Conference on Biomaterials - GRIBOI, Bern, Suisse, 16-18 mars 2006.

Abstract: European Cells and Materials, 2006. Vol. 11, Suppl. 1, p36

2/ S. Desmons

« **Effets d'une irradiation laser sur la vascularisation en site osseux sain et irradié: Etude préliminaire *in vivo*.** »

7eme Journée André Verbert, Ecole Doctorale de Lille, le 27 septembre 2007.

3/ S. Desmons, C. Delfosse, P. Rochon, B. Buys, G. Penel, S. Mordon.

“**Effect of a Laser irradiation on the vascularisation of safety and X-ray radiated bone**”

29th International Conference of the IEEE, Engineering in Medicine and Biology Society. Lyon, France, 23 - 26 Août 2007

# RESUME

## **Objectif:**

L'application d'un stress supraphysiologique (préconditionnement) induit une résistance cellulaire et tissulaire augmentée face à une agression secondaire. Des protéines appelées protéines de choc thermique (HSPs) sont exprimées physiologiquement suite à ce stress qu'il soit de nature mécanique, chimique ou physique. Cette réponse, validée sur différents tissus mous, est évaluée ici en site osseux membraneux. Ce mécanisme de preconditionnement présente une nouvelle approche dans l'amélioration de la cicatrisation osseuse mettant en avant l'utilisation des capacités d'auto protection du tissu osseux. L'hypothèse de ce travail est qu'un stress thermique peut préserver le tissu osseux soumis secondairement à une irradiation aux rayons X. Pour valider cette hypothèse, cette étude nécessite:

- Le développement d'un modèle d'étude de la vascularisation osseuse superficielle, indicateur de la réponse osseuse *in vivo* sur le long terme.
- Le paramétrage du traitement laser requis en tant que moyen de chauffage pour induire le preconditionnement du tissu osseux.
- La détermination d'un protocole d'irradiation aux rayons X utilisé comme méthode quantifiable et reproductible de lésion secondaire
- La mise au point d'une technique d'immunohistochimie afin de caractériser les résultats obtenus lors de l'étude *in vivo* et de mettre en évidence la présence de HSP70 (forme inductible de HSP produite suite à un stress).

## **Matériels et Méthodes:**

Une étude préliminaire vise à déterminer la puissance du tir laser. Elle fait appel à des mesures de température en milieu osseux et à une modélisation mathématique de la distribution de la chaleur dans le tissu en fonction de la puissance du tir laser. Le système laser est choisi et paramétré pour induire une augmentation contrôlée de la température osseuse de l'ordre de 10 à 15°C, température retenue dans la littérature.

Le protocole d'irradiation aux rayons X est défini pour créer une lésion osseuse localisée et pour limiter les effets secondaires au niveau des structures sous jacentes.

Un modèle de chambre optique implantée sur le crâne de lapins est développé pour assurer l'observation longitudinale d'un même site osseux chez le même animal. Le réseau vasculaire superficiel est observé pendant 12 semaines par la prise hebdomadaire de photographies numériques. Un traitement informatique standardisé des images évalue la densité vasculaire (*Imaq Vision Builder*®), et différents critères morphologiques (*Aphelion*™): longueur totale du réseau vasculaire, nombre de nœuds, et nombre de vaisseaux en fonction

de leur diamètre. L'expérimentation *in vivo* est conduite sur 20 lapins divisés en quatre groupes : groupe #1 : groupe contrôle (n=5); groupe #2: traitement laser (n=5); groupe #3 : irradiation par rayons X (n=5) ; groupe #4 : préconditionnement laser avant irradiation par rayons X (n=5).

L'analyse histologique et le marquage de HSP70 sont effectués sur des prélèvements osseux après la mise en place d'un protocole de fixation, décalcification et traitement immunohistochimique adapté.

### **Résultats:**

Un système diode-laser (815nm, 36J/cm<sup>2</sup> : un tir de 1.5W pendant 3 sec) est retenu pour le préconditionnement. L'étude préliminaire montre que ces paramètres induisent un chauffage tissulaire homogène et précis de l'ordre de 10 à 15°C, et hautement reproductible.

L'irradiation aux rayons X est appliquée par un générateur de rayons X de basse énergie en une dose unique de 18.75 Gy. Cette irradiation induit une lésion osseuse caractérisée par une hypocellularité et une hypovascularisation.

Notre modèle animal permet une observation du réseau vasculaire osseux superficiel comme le montrent les analyses histologiques et en spectrométrie Raman. Après la phase chirurgicale, la chambre optique permet une application des irradiations laser et par rayons X sans traumatisme secondaire. Les effets des traitements appliqués sont observés pendant 12 semaines.

Le réseau vasculaire (densité vasculaire et critères morphologiques) est stable pour le groupe #1 et pour le groupe #2 pendant toute la durée de l'étude (12 semaines). Elle montre une chute significative pour les groupes #3 et #4 caractéristique de l'effet antiangiogénique des rayons X pour chaque critère vasculaire observé. Cependant, cette diminution vasculaire est limitée pour le groupe #4 vs. le groupe #3 et ceci en particulier pour les vaisseaux de large diamètre. L'analyse en histologie standard confirme ces résultats.

Parallèlement, l'analyse immunohistochimique montre un marquage positif de HSP70 au niveau du réseau vasculaire osseux 18h après une irradiation laser.

### **Discussion:**

Le préconditionnement laser préserve la vascularisation osseuse superficielle des dommages induits par l'irradiation aux rayons X. Pour la première fois, cet effet cytoprotecteur est décrit en site osseux membraneux. Ainsi, notre étude montre que l'application laser utilisée comme méthode de chauffage localisée et reproductible, favorise la résistance aux effets antiangiogéniques des rayons X. Cet effet protecteur est observé *in vivo* au niveau vasculaire en particulier pour les vaisseaux les plus larges. Le marquage immunohistochimique confirme que le préconditionnement laser induit au niveau osseux la production de HSP70, molécule chaperone décrite pour son action protectrice. Ce travail innovant offre la perspective

d'accélérer et de favoriser la cicatrisation osseuse dans des situations défavorables ou après une chirurgie programmée grâce à une mise en condition tissulaire.

## **ABSTRACT:**

### ***Laser preconditioning in membranous bone site***

#### **Objective:**

The application of a non lethal heat shock has been proven to limit the extent of subsequent injuries. This phenomenon known as preconditioning postulates that a supraphysiological stress prior to injury may have a cytoprotective effect.

Specific proteins called Heat Shock Proteins (HSPs) are expressed physiologically after applying stress (mechanical, chemical or physical). In this study, the preconditioning response, already validated on various soft tissues, is assessed in bone tissue. This mechanism of preconditioning is a new approach in improving bone healing by employing its capacity for self protection. The hypothesis for this work is that the application of a well-defined heat stress could preserve bone subsequently injured with X-ray irradiation. For this purpose, this study required:

- The establishment of laser treatment as a proven method of applying heat in order to achieve this protective effect.
- A protocol for X-ray irradiation in order to induce bone tissue injury in a controlled and reproducible way.
- The de novo development of a bone chamber model in order to study the superficial bone vascularisation as an indicator of the in vivo bone response.
- A novel immunohistochemical method to highlight the presence of HSP70 (a stress-related form of HSP) in vivo.

#### **Materials and Methods:**

A preliminary study uses bone temperature measurements and mathematical modelling of the heat distribution in bone tissue to determine the adequate power of the laser shot. Laser system was chosen and set to apply heat on bone at a 10-15°C rate defined by literature.

X-ray irradiation was defined in order to create a localized bone lesion and to limit subsequent injuries.

An original bone chamber model was implanted onto the skull of rabbits in order to monitor a specific membranous bone site in the same animal. The superficial vascular network was observed through digital pictures taken weekly for a total of 12 weeks. A standardized image processing software evaluates vascular density (*Imaq Vision Builder*©) and different morphological criteria (*Aphelion*<sup>TM</sup>): the total length of the vascular network, the number of nodes as well as the number of vessels classified by diameter size. In vivo experiments were conducted on 20 rabbits divided into four groups: group # 1: control group (n = 5); group # 2:

laser treatment (n = 5), group # 3: X-ray radiation (n = 5); group # 4: laser preconditioning prior to X-ray radiation (n = 5).

Histological analysis and HSP70 immunohistochemistry of bone samples were carried out after the establishment of the protocol of fixing, decalcification and immunohistochemical labelling.

### **Results:**

A diode laser system (815nm, 36J/cm<sup>2</sup>: shot 1.5W for 3 sec) was used for preconditioning. The preliminary study showed that these parameters induce heating tissue consistent and accurate in the order of 10 to 15 ° C, and highly reproducible.

X-ray irradiation consisted of a single dose of 18.75 Gy applied with a low energy X-ray beam. Those X-ray radiation-induced damages are characterized by a hypocellularity and hypovascularisation of the bone.

Histological analysis and Raman spectroscopy of our animal model indicated an observation of the superficial bone vascular network. After a surgical phase, the optical chamber allows laser radiation and X-ray applications without secondary trauma. Consequently, the observed effects can be attributed to the different treatments

The vascular network (vascular density and morphologic criteria) was stable for group # 1 and group # 2 during the 12-week follow-up. The in vivo study showed a significant reduction of each vascular network parameter for groups # 3 and # 4 which is characteristic of an X-ray-induced antiangiogenic effect. However, this reduction was limited in the laser preconditioning group # 4 vs. X-ray group # 3. This was particularly true for large vessels. Standard histology analysis confirmed these results.

Immunohistochemical analysis illustrated positive staining of HSP70 in a bone vascular network 18h after laser irradiation.

### **Discussion:**

Laser preconditioning preserved superficial bone damage induced by X-ray irradiation. For the first time, this cytoprotective effect has been described in a bone site. Our study demonstrated that the laser application, used as a localized and reproducible way to apply heat, increased tissue resistance against the antiangiogenic effect of X-ray irradiation. This protective effect was mainly observed in larger vessels. Immunohistochemical staining confirmed that laser preconditioning induced HSP70 (chaperon molecule) production in the vascular bone network. This innovative work introduces the concept of laser pre-treatment in order to promote bone healing following surgical trauma.

## Table des Matières:

1. INTRODUCTION .....	22
2. BACKGROUND ET PROBLEMATIQUE .....	25
2.1. Tissu osseux et cicatrisation.....	26
2.1.1. Composition de l'os .....	26
2.1.2. Le tissu osseux et son remodelage .....	26
2.1.3. Les os plats.....	27
2.2. Vascularisation osseuse : .....	28
2.2.1. Le périoste .....	29
2.2.2. Le système médullaire.....	30
2.3. Vascularisation osseuse et cicatrisation .....	31
2.3.1. Importance du système vasculaire osseux.....	31
2.3.2. Physiologie de la cicatrisation osseuse .....	31
2.3.3. Modulation de l'angiogénèse : conséquences sur l'ostéogénèse.....	32
3. PRECONDITIONNEMENT.....	33
3.1. Définition.....	34
3.2. Préconditionnement et HSP .....	34
3.3. Préconditionnement tissulaire : Etat de l'Art.....	38
3.4. Seuil de dénaturation du tissu osseux.....	43
3.5. Définition de la fenêtre d'action : .....	46
4. DE L'IDEE A LA PRATIQUE : CHOIX ET MISE EN SCENE DES ACTEURS .....	49
4.1. Modèle de cicatrisation osseuse .....	50
4.1.1. Intérêts du modèle animal : .....	50
4.1.2. Choix du site d'implantation .....	51
4.2. Laser et tissu osseux.....	51
4.2.1. Le laser : définition et caractéristiques .....	51
4.2.2. Interaction Laser- Tissu osseux.....	53
4.2.3. Création de la source de chaleur : longueur d'onde et diamètre du spot .....	54
4.2.3.1. Choix de la longueur d'onde .....	55
4.2.3.2. Choix du diamètre du spot.....	56
4.2.4. Transfert de la chaleur et effet biologique: Détermination de la durée du tir laser . .....	57
4.3. Lésion secondaire induite : irradiation par rayons X.....	60
4.3.1. Effets des rayons X sur le tissu osseux .....	60
4.3.2. Paramétrage de l'irradiation par rayons X .....	61

4.3.2.1.	Atténuation du rayonnement X en milieu osseux.....	61
4.3.2.2.	Choix du type de rayonnement X.....	62
4.4.	Analyse immunohistologique.....	65
5.	MATERIELS ET METHODES .....	71
5.1.	Le modèle animal .....	72
5.1.1.	La chambre optique .....	72
5.1.2.	La pose chirurgicale.....	73
5.2.	Caractérisation de l'interface .....	75
5.2.1.	Analyse Raman .....	75
5.2.2.	Analyse histologique de l'interface chambre optique/os : .....	77
5.3.	Etude de la vascularisation osseuse .....	78
5.3.1.	Matériels .....	78
5.3.2.	Analyse de l'image.....	79
5.3.2.1.	Analyse des images par Imaq Vision Builder® .....	79
5.3.2.2.	Analyse des images par Aphelion™ .....	81
5.3.3.	Analyse statistique.....	83
5.3.3.1.	Calcul de la densité vasculaire .....	83
5.3.3.2.	Caractéristiques morphologiques .....	84
5.4.	Etude préliminaire : détermination de la puissance du tir laser .....	85
5.4.1.	Caractéristiques techniques du laser.....	85
5.4.2.	Matériels de mesure de température.....	87
5.4.3.	Méthode.....	88
5.4.4.	Protocole d'irradiation par rayons X.....	90
5.5.	Protocole de l'étude in vivo.....	90
5.6.	Histologie.....	92
5.6.1.	Analyse histologique standard .....	92
5.6.2.	Analyse immunohistologique .....	93
6.	RESULTATS .....	95
6.1.	Validation du modèle animal .....	96
6.1.1.	Tolérance à la chambre optique .....	96
6.1.2.	Analyse Raman .....	97
6.1.3.	Analyse histologique de l'interface chambre optique/os : .....	100
6.2.	Paramétrage du tir laser : Résultats de l'étude sur os sec .....	101
6.2.1.	Mesures de température.....	101
6.2.2.	Modélisation.....	103
6.2.3.	Paramètres retenus .....	106

6.2.4.	Contrôle histologique .....	107
6.3.	Résultats de l'étude <i>in vivo</i> .....	108
6.3.1.	Etude <i>in vivo</i> : évolution de la densité vasculaire (DV) .....	108
6.3.2.	Etude de la morphologie du réseau vasculaire.....	110
6.3.3.	Analyse histologique.....	114
6.3.4.	Analyse immunohistologique.....	121
7.	DISCUSSION .....	123
7.1.	Le modèle .....	124
7.1.1.	La zone observée .....	124
7.1.2.	La méthode d'analyse.....	126
7.1.3.	La tolérance de la chambre optique .....	127
7.1.4.	Limites du modèle.....	127
7.2.	Le Laser.....	128
7.2.1.	Le laser : un moyen de chauffage fiable.....	128
7.2.2.	Paramétrage du laser .....	130
7.3.	L'effet du préconditionnement laser sur la cicatrisation osseuse .....	132
7.3.1.	Effet de l'irradiation par rayons X.....	132
7.3.2.	Impact du préconditionnement laser.....	133
7.4.	Perspectives cliniques potentielles .....	136
7.5.	Perspectives scientifiques .....	138
8.	CONCLUSION.....	141
9.	TABLE DES FIGURES :.....	143
10.	TABLE DES TABLEAUX .....	145
11.	BIBLIOGRAPHIE:.....	146

## **1. INTRODUCTION**

La stimulation de la cicatrisation osseuse est un problème qui concerne de nombreuses disciplines : la chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, ou encore la cancérologie. Ainsi, la prise en charge d'un trauma osseux, quelque soit son origine, est difficile, longue et souvent mal vécue par les patients. Le recours à l'implantation de moyens d'ancrage support de prothèses est aujourd'hui un protocole thérapeutique largement utilisé en présence de perte dentaire mais également face à des défauts osseux conséquences de lésions cancéreuses, de malformations ou encore d'amputations traumatiques. L'ostéointégration de ces moyens d'ancrage est un enjeu important dans le cadre de la réhabilitation orale et plus largement au niveau craniofacial et orthopédique.

En 2007, plus de 8 millions d'implants dentaires ont été posés sur plus de 3 millions de patients partiellement ou totalement édentés. Le champ de l'implantologie s'étend également à l'oto-rhino-laryngologie, la chirurgie de la tête et du cou, la chirurgie plastique, la chirurgie orthopédique et également la chirurgie de la main. Le nombre de patients réhabilités par ce concept est aujourd'hui en plein essor et a été estimé en 2007 à environ 45000 (Albrektsson 2005).

Le taux de succès en implantologie est basé sur l'ostéointégration de l'implant définie comme étant une fixation rigide et stable au niveau du site osseux receveur (Branemark 1985; Zarb et coll. 1991). Ainsi, la qualité osseuse influe sur le succès implantaire et également sur le délai de la mise en charge implantaire. En effet, cette dernière peut être immédiate ou différée de plus de 6 semaines en fonction des caractéristiques du tissu osseux (Albrektsson 2005). D'après Gaspard, il existe différents types d'os (Gaspard 1978):

- l'os spongieux trabéculaire est idéal pour l'implantologie
- l'os papyracé avec des fibres conjonctives en continuité avec celles du périoste où la stabilisation primaire de l'implant est difficile à obtenir
- l'os cortical, pauvrement vascularisé, cicatrise quatre fois plus lentement que l'os spongieux.

A l'heure actuelle, l'implantologie connaît un taux de succès proche des 95%. Cependant la pose d'implant dans un os cortical montre un taux d'échec de ces implants, allant jusque 25% (Bert 1994). En effet, l'ostéointégration varie en fonction d'un certain nombre de paramètres : nature, longueur et forme de l'implant, hauteur et densité osseuse, du protocole chirurgical, etc. Parmi ces paramètres, l'un des plus méconnus est la vascularisation de l'os (Bert 2006). Un os faiblement vascularisé est un critère défavorable à l'ostéointégration. Par ailleurs, dans le cadre des cancers des voies aéro-digestives supérieures, les reconstructions en prothèse maxillo-faciale peuvent nécessiter la pose d'implants en zones « sinistrées » suite à des chirurgies ou des radiothérapies (Brogniez et coll. 1998; Granstrom et coll. 1999).

Ce sont ces cas « extrêmes », les 25% d'échecs d'ostéointégration dans un os cortical ou encore le délai de mise en charge, la réduction de la durée de traitement et l'élargissement des indications qui constituent actuellement le challenge proposé aux praticiens.

Afin d'optimiser les résultats, de nombreuses études se sont intéressées au perfectionnement des caractéristiques biomécaniques des matériaux, à l'élaboration du protocole chirurgical optimal et à l'importance de la gestion des tissus mous environnants et de l'occlusion (Bert 2004). Une autre stratégie a pour objet une meilleure compréhension de la biologie de l'os afin de valoriser les chances de succès.

Ainsi, notre second chapitre s'intéresse à une mise au point sur les processus de cicatrisation osseuse. La connaissance des différents facteurs impliqués dans la cicatrisation osseuse permet d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

De récentes données montrent que l'application d'un stress supraphysiologique (qu'il soit d'origine thermique, chimique ou mécanique), induit un effet cytoprotecteur au niveau cellulaire. La résistance cellulaire et tissulaire est alors augmentée face à une agression secondaire. En effet, comme il est exposé dans le chapitre 3, une stimulation tissulaire pré thérapeutique favorise la cicatrisation de différents tissus. Ce travail a pour objectif de tester la possibilité de mise en condition du tissu osseux en faisant appel à ses capacités d'autodéfense. Cette réponse aussi appelée préconditionnement est obtenue sur différents types de tissus mous, mais n'a jamais été évaluée sur tissus minéralisés.

L'objet de cette thèse est d'étudier *in vivo* les effets d'une application laser (utilisée en tant que traitement préconditionnant) sur le tissu osseux secondairement lésé par une irradiation par rayons X. Le but est d'observer la réponse du tissu osseux et d'étudier la possibilité d'une mise en condition tissulaire osseuse avant une intervention chirurgicale.

Cette approche innovante vise à stimuler les capacités d'autodéfense, de réparation du tissu osseux et donc d'optimiser et d'accélérer sa cicatrisation.

L'objectif final est la mise au point d'une technique simple, fiable et reproductible favorisant la cicatrisation osseuse en stimulant la vascularisation. Les applications cliniques d'une telle technique pourraient être très nombreuses. Dans les domaines de la chirurgie orthopédiques, maxillo-faciale ou buccale, elle pourrait, par exemple, favoriser l'intégration d'implants dans des zones osseuses défavorables. En carcinologie, cette technique pourrait être utilisée pour stimuler le potentiel de cicatrisation des tissus existant et réduire certaines des complications liées aux thérapies. L'apparition d'effets secondaires tels que des problèmes d'inhibition d'ostéointégration ou d'apparition d'ostéoradionécrose serait ainsi limitée.

## **2. BACKGROUND ET PROBLEMATIQUE**

## **2.1. Tissu osseux et cicatrisation**

### **2.1.1. Composition de l'os**

L'os est un matériel composite très hétérogène. Il est composé de deux tissus principaux : le tissu osseux et la moelle hématopoïétique, qui sont en interaction étroite.

La moelle hématopoïétique est composée de cellules souches, d'adipocytes et produit les cellules des différentes lignées sanguines. Elle se situe dans les espaces médullaires, entre les travées osseuses.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif très différencié, hautement spécialisé, à trame organique et minérale. Il assure deux fonctions principales : une fonction mécanique (résistance, adaptation aux contraintes) et une fonction métabolique (homéostasie phosphocalcique). Macroscopiquement, on décrit deux parties distinctes : la partie externe dense (os cortical) et une partie interne plus alvéolée (os spongieux). Structurellement, l'os cortical a une densité pouvant atteindre  $1.6 \text{ g/cm}^3$ . Il se compose de 70% de matériel inorganique et de 30% de protéines. La partie minérale se compose de phosphate de calcium apatitique (apatite carbonatée essentiellement). La matrice organique est constituée à 90% de collagène de type I qui forme une matrice entrelacée servant d'échafaudage à l'organisation des cristaux minéraux. On compte plus de 200 protéines non-collagéniques différentes ayant un rôle dans la formation et la minéralisation osseuse (De Vernejoul 1996).

### **2.1.2. Le tissu osseux et son remodelage**

Caractérisé par sa dureté et son apparente rigidité, le tissu osseux est cependant un tissu dynamique en perpétuel remaniement capable de se réparer *ad integrum*. La durée d'un cycle total de remodelage est d'environ trois mois pour l'os adulte.

Les cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes), issues du tissu hématopoïétique, forment des « unités de remodelage ». Ces unités de remodelage s'activent les unes après les autres, si bien que le phénomène n'est pas synchrone dans le squelette (Frost 1964).

Les unités de remodelage assurent le remaniement permanent faisant appel à des mécanismes complexes divisés en deux phases :

- Une phase de résorption pendant laquelle les ostéoclastes issus des monocytes-macrophages résorbent le tissu osseux en détruisant la matrice extracellulaire. Cette résorption forme une lacune appelée « lacune de Howship ».

- Une phase d'apposition où les ostéoblastes dérivés du stroma conjonctif de la moelle osseuse, synthétisent le collagène de type I et des protéines non collagéniques de la matrice extracellulaire. Cette phase de reconstruction correspond à la formation de la substance ostéoïde. Le dépôt des cristaux d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  au niveau des sites de nucléation des fibrilles de tropocollagène amorce la phase minérale au sein de cette matrice (Martin 2006).

Le renouvellement osseux est assuré par un équilibre entre les processus d'apposition ostéoblastique et de résorption ostéoclastique. Cet équilibre est finement régulé par l'expression de facteurs locaux RANK/ RANK-L/OPG, cytokines, prostaglandines et autres facteurs de croissance. Ces substances sont sécrétées de façon basale en surface des cellules ostéoblastiques et sont régulées par les interactions entre les hormones et de nombreux facteurs circulants ou locaux. Les cellules ostéoblastiques jouent donc un rôle essentiel dans le contrôle du remodelage osseux. La présence d'ostéoblastes est nécessaire à la différenciation des ostéoclastes matures qui sont les premiers acteurs du remodelage (De Vernejoul 1996). Nous sommes donc face à une balance apposition ostéoblastique / résorption ostéoclastique finement régulée.

### **2.1.3. Les os plats**

Le massif maxillo-facial est principalement composé d'os plats. Les os plats sont des os membraneux dont l'élaboration se fait directement à partir des tissus mésenchymateux environnants.

Physiologiquement, un os primaire (aussi appelé « woven bone ») de type fibreux se forme. Ce dernier est ensuite remanié par les cellules osseuses. Les fibres de collagène s'organisent et dirigent l'orientation de la minéralisation.

Des systèmes haversiens se constituent alors. Ils se définissent par un ensemble de lamelles concentriques minéralisées autour d'un canal central contenant un vaisseau sanguin comme le montre la Figure 1. Ces systèmes de Havers sont alignés parallèlement au grand axe de l'os répartissant de manière efficace les tensions.

Les ostéocytes sont définis comme des ostéoblastes emprisonnés dans la matrice osseuse qu'ils ont synthétisée.

Le remodelage physiologique du tissu osseux se traduit par une maturation et un enchevêtrement de ces systèmes de Havers donnant une image histologique caractéristique (Figure 1) (Glowacki 1998).

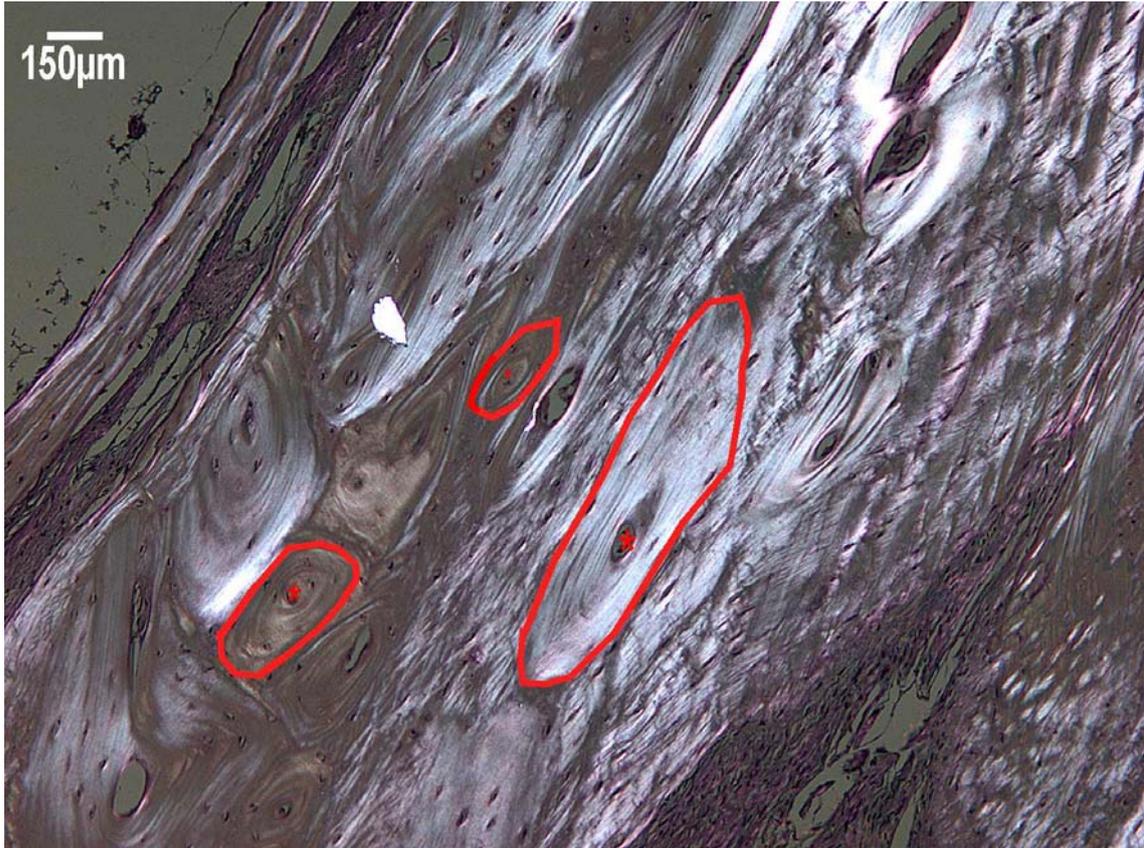


Figure 1 : Coupe de tissu osseux vue en polarisation : Organisation en système de Havers.  
 \* : capillaire au centre d'un système de Havers (entouré en rouge). La polarisation ou birefringence montre une organisation concentrique du collagène autour d'un capillaire.

Les capillaires au centre des systèmes de Havers sont en connexion avec les éléments vasculaires de la moelle osseuse et du périoste. Il existe une interconnexion entre le périoste externe et la médullaire interne par l'intermédiaire des canaux de Volkman. L'intégrité de ce réseau est essentielle à l'apport de nutriments, d'oxygène et de cellules progénitrices comme nous allons l'exposer ci-après.

## **2.2. Vascularisation osseuse :**

La phase minérale du tissu osseux impose un système vasculaire particulier. Cependant, comme pour tous les tissus vivants, les vaisseaux sanguins ont un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle tissulaire (Ballara et coll. 1999).

Le système vasculaire osseux s'articule autour de deux structures particulières. Le périoste forme une couche externe, alors que le système médullaire est prisonnier au centre du tissu

osseux comme le montre la Figure 2. La vascularisation d'un os cortical est caractérisée par la présence d'un réseau micro vasculaire avec des sinusoides médullaires, des capillaires périostés et des capillaires corticaux (McCarthy 2006).



Figure 2: Organisation de la vascularisation osseuse *adapté d'après McCarthy*

*De la gauche vers la droite : réseau périosté puis cortical et enfin trabéculaire démontrant les interconnexions entre ses différents réseaux. (McCarthy 2006)*

### 2.2.1. Le périoste

Le périoste, ou membrane périostée, est une membrane continue fibro-élastique contenant des cellules mésodermiques pluripotentiels qui recouvre l'os auquel il est intimement lié. Le périoste est constitué de deux couches :

- Une couche superficielle fibreuse
- Une couche profonde ou cambiale contenant des cellules souches et des préostéoblastes. Elle est constituée d'épais faisceaux de fibres de collagène arciformes pénétrant profondément dans le tissu osseux (De Vernejoul 1996).

L'importance de la vascularisation périostée a été montrée au niveau des os longs. Ainsi, 70 à 80 % de la vascularisation artérielle et 90 % de la vascularisation veineuse de l'os cortical long sont assurées par la vascularisation périostée (Chanavaz 1995). Au niveau cranio-

facial, une vascularisation de type terminale majore l'importance du réseau vasculaire superficiel.

Des artères de moyen calibre issues du périoste pénètrent les corticales osseuses, elles se ramifient en artérioles puis en capillaires artériels. Chaque système de Havers est centré autour d'un capillaire issu du système périosté. Les vaisseaux périostés forment des anneaux vasculaires autour des corticales osseuses. Ils sont réunis par des chaînes anastomotiques longitudinales.

### **2.2.2. Le système médullaire**

Le système médullaire est composé du tissu hématopoïétique et est constitué de 2 parties fondamentales :

1. une trame conjunctivo-vasculaire formée de la matrice extracellulaire et de cellules stromales.

Ces cellules stromales sont les cellules du tissu de soutien conjonctif médullaire. Elles dérivent des cellules souches hématopoïétiques, qui se différencient en divers types cellulaires : cellules endothéliales, ostéoblastes, fibroblastes, adipocytes. Elles synthétisent la matrice extracellulaire qui est un réseau de fibrilles définissant des mailles. Ces dernières supportent l'accrochage des diverses cellules de l'hématopoïèse.

2. Le parenchyme hématopoïétique constitué d'une juxtaposition des diverses cellules myéloïdes (mégacaryocytes, érythroblastes, les éléments de la lignée myéloïde et de la lignée lymphoïde) dans des logettes médullaires définies par des lamelles osseuses.

Le système médullaire est responsable de la production des cellules de la lignée sanguine. En plus, comme le périoste, le système médullaire a un rôle fonctionnel : nutrition, oxygénation, production de facteurs de croissance, et libération de cellules matures.

C'est un organe à part entière irrigué par les artères nourricières de l'os. Celles-ci donnent des ramifications centrales puis des artérioles dirigées vers la périphérie des cavités osseuses.

Ainsi, les capillaires de la corticale osseuse se transforment en sinusoides lorsqu'ils pénètrent dans la moelle. Ces sinusoides sont d'abord contournées avec de multiples divisions et anastomoses. Ils sont collectés dans les sinusoides droites, puis dans les sinus centraux et enfin dans les veinules et veines émergeant de l'os. Le retour veineux s'organise par le biais de multiples sinusoides veineux.

## **2.3. Vascularisation osseuse et cicatrisation**

### **2.3.1. Importance du système vasculaire osseux**

Tous les tissus, excepté le cartilage, exigent le développement d'une microvascularisation pour guérir. Ainsi les vaisseaux sanguins ont un rôle crucial dans les processus de cicatrisation. L'importance de la vascularisation durant le développement osseux et les phases de cicatrisation est décrite depuis de nombreuses années (Leunig et coll. 1994). L'ostéogenèse est déterminée par l'interaction des ostéoclastes, des ostéoblastes et de l'angiogénèse (Glowacki 1998; Gerber et coll. 1999; Hansen-Algenstaedt et coll. 2006). L'angiogénèse, processus de formation de nouveaux capillaires sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant, est l'une des clefs de la régénération osseuse. Il s'agit d'un processus étroitement contrôlé, dont le résultat en fin de processus de cicatrisation est un équilibre entre le maintien de vaisseaux sanguins matures, la formation de nouvelles structures et la régression des capillaires sanguins nouvellement formés (Ballara et al. 1999).

### **2.3.2. Physiologie de la cicatrisation osseuse**

Lors d'une phase de cicatrisation osseuse, les séquences observées sont toujours identiques.

Une fracture osseuse induit une interruption de la circulation sanguine qui conduit en phase aiguë à une hypoxie et une nécrose du tissu osseux et de la moelle adjacente. Après une phase hémorragique et la libération de facteurs thrombotiques, la première étape de la cascade curative est le développement d'une réponse inflammatoire avec une migration accrue de nouvelles cellules endothéliales et de cellules ostéoprogénitrices. Ceci se traduit par une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à une adaptation structurelle du réseau dont la densité augmente (Hansen-Algenstaedt et al. 2006).

Physiologiquement, la revascularisation de la zone tissulaire lésée est la première étape du processus de cicatrisation. Sous l'effet de stimuli angiogéniques, les cellules endothéliales se détachent et migrent au travers la membrane basale, qui se fragmente et disparaît. Les cellules migrantes prolifèrent, s'organisent en tubes ou « pointes d'accroissement » et élaborent une nouvelle membrane basale. L'activation des cellules endothéliales s'accompagne de la dégradation de certains composants de la matrice extra cellulaire, sous l'action de protéases. Cette dégradation favorise la migration cellulaire, la libération de facteurs de croissance et l'activation des unités de remodelage (Marcelli 1993). Elle est suivie d'une prolifération des

cellules ostéoclastiques qui après résorption du tissu lésé cède la place à une prolifération ostéoblastique accompagnée d'une production de la matrice ostéogénique. La formation d'un woven bone débute, puis est suivie d'un remodelage jusqu'à obtention d'un os mature (Probst et coll. 1997; Gerber et al. 1999).

La régénération tissulaire complète, avec restauration *ad integrum* des propriétés mécaniques, signe la fin du processus de cicatrisation du tissu osseux. La structuration du réseau vasculaire précède donc l'apparition de l'os primaire puis le nombre de vaisseaux sanguins diminue parallèlement à la maturation du tissu (Ohtsubo et coll. 2003)

Ainsi les processus de recrutement cellulaire et d'activation des cellules ostéoprogénitrices dépendent des propriétés de la microcirculation. Le rétablissement d'un réseau vasculaire fonctionnel précède non seulement la néoformation osseuse mais a également une influence conséquente sur la qualité de cette formation (Wallace et coll. 1991; Wallace et coll. 1995).

### **2.3.3. Modulation de l'angiogénèse : conséquences sur l'ostéogénèse**

L'angiogénèse et l'ostéogénèse sont donc étroitement liées pendant la réparation et le remodelage osseux. Ce lien a été mis en évidence lors de nombreuses études (Carano et coll. 2003). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de l'angiogénèse pendant la phase de réparation conduit à une cicatrisation par formation d'un tissu fibreux. L'ostéogénèse est donc totalement dépendante de l'activité angiogénique (Carano and Filvaroff 2003).

En 2000, Engsig et al. montrent que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), principal facteur angiogénique, coordonne les différentes phases du remodelage osseux, c'est à dire : la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, des ostéoclastes et des ostéoblastes, favorisant ainsi l'angiogénèse (Engsig et coll. 2000). L'inhibition de cette dernière induit la réduction du volume minéralisé avec la persistance de woven bone (Carano and Filvaroff 2003). Par conséquent, l'angiogénèse et les propriétés structurelles et fonctionnelles de la microcirculation sont des éléments clés pendant l'ostéogénèse.

### **3. PRECONDITIONNEMENT**

### **3.1. Définition**

Un stress tissulaire contrôlé (qu'il soit d'origine mécanique, thermique ou chimique) avant une lésion secondaire induit un effet cytoprotecteur sur les tissus mous. Cette mise en condition tissulaire permet aux cellules de résister à une agression métabolique secondaire physiologiquement létale.

Ce phénomène désigné sous le terme de « préconditionnement », est défini comme changement provisoire du métabolisme cellulaire préservant ses fonctions physiologiques. L'effet protecteur a déjà été démontré sur des tissus mous secondairement soumis à une ischémie, à une lésion aiguë ou encore à une réponse inflammatoire aiguë (Neschis et coll. 1998; Ito et coll. 1999; Pespeni et coll. 2005; Rucker et coll. 2005). L'effet protecteur de ce préconditionnement induisant une tolérance vis-à-vis de stress ultérieurs, suggère de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La manipulation sélective de mécanisme de défense cellulaire endogène représente une approche innovante pour le contrôle et la prévention des lésions tissulaires qui a déjà fait l'objet de nombreuses études qui sont exposées ci-après (pour revue : (Latchman 1998; Latchman 2004)).

### **3.2. Préconditionnement et HSP**

Un stress supraphysiologique induit une réaction tissulaire universelle appelée HSR : Heat Shock Response. Elle a été décrite pour la première fois chez la drosophile suite à un choc thermique (Tissieres et coll. 1974) et a ensuite été retrouvé chez tous les organismes en réponse à des stress d'origine variée (Neschis et al. 1998; Ito et al. 1999; Kelty et coll. 2002; Capon et coll. 2003; Harder et coll. 2005; Pespeni et al. 2005; Rucker et al. 2005).

Cette réponse est caractérisée par un changement rapide de l'expression génétique. Ainsi, l'expression de protéines spécifiques appelées protéines de choc thermique (HSPs) devient métaboliquement dominante. Elles sont alors produites dans la cellule à des niveaux élevés (Hightower 1991). Ces changements métaboliques confèrent à la cellule une résistance élevée.

Etonnamment, les gènes codant les HSPs sont parmi les plus hautement conservés au cours de l'évolution. Cette conservation représente un très bel exemple d'adaptation aux stress environnementaux corrélée à l'évolution (Pespeni et al. 2005).

Les Heat Shock Proteins (HSPs) sont de grandes molécules polypeptidiques de structure complexe. Cette super famille de molécules regroupe deux groupes de molécules : constitutives ou inductibles par à un stress. Ce stress peut être de différentes natures mais engendre irrémédiablement une dénaturation protéique (Becker et coll. 1994).

Les HSP sont un des moyens de défense de l'organisme au niveau cellulaire en intervenant à tous les niveaux cellulaires (Figure 3). Leur rôle essentiel est de préserver l'intégrité cellulaire face aux agents dénaturants en maintenant la conformation et l'homéostasie des protéines cellulaires (Craig 1985). Globalement, les HSP ont la possibilité de :

- Conformer de nouvelles protéines,
- Transporter des protéines pour une restructuration de la configuration spatiale,
- Protéger les protéines nucléaires et matricielles en agissant telles des molécules chaperons,
- Réparer ou éliminer les protéines altérées.

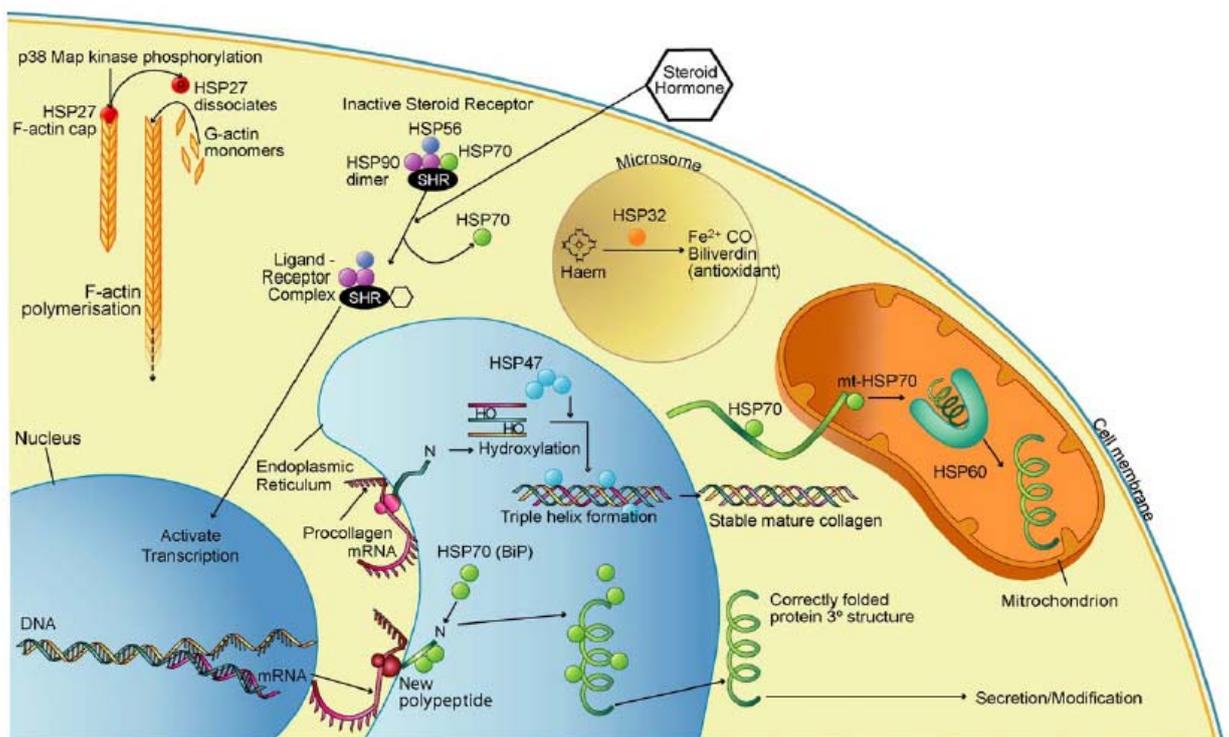


Figure 3: Fonctions des HSP constitutives dans la cellule d'après Wagstaff

*Les HSP présentes dans chaque compartiment cellulaire, jouent un rôle de protection des constituants primordiaux à la cellule (Wagstaff et coll. 2007).*

Notre étude s'intéresse plus particulièrement à la famille des HSP70 (définis par leurs poids moléculaires de l'ordre de 70kDa). Chez les eucaryotes, les membres de cette famille ont une

localisation nucléaire ou cytoplasmique. Cette famille regroupe 4 isomères inducibles en réponse au stress:

- HSP70.1 et HSP70.3 sont les principales protéines induites, elles migrent dans le noyau durant le stress,
- HSP72 est une deuxième isoforme, présente dans le cytoplasme cellulaire,
- HSP68 a également été décrite (Wirth 2002).

Ces isoformes protéiques se lient aux résidus de protéines dénaturées, empêchant leur agrégation intracellulaire et leurs précipitations.

Molécules chaperons, elles s'associent à des molécules complexes de manière réversible. Elles transfèrent ces protéines à l'intérieur et hors des compartiments subcellulaires participant ainsi au repliement ou à la protéolyse. Elles chaperonnent également la synthèse et le transport des nouvelles protéines. Elles sont à l'origine d'une résistance cellulaire face à l'apoptose et accélèrent ainsi la récupération tissulaire par l'intermédiaire des mécanismes illustrés dans la Figure 4 (Wagstaff, Shah et al. 2007).

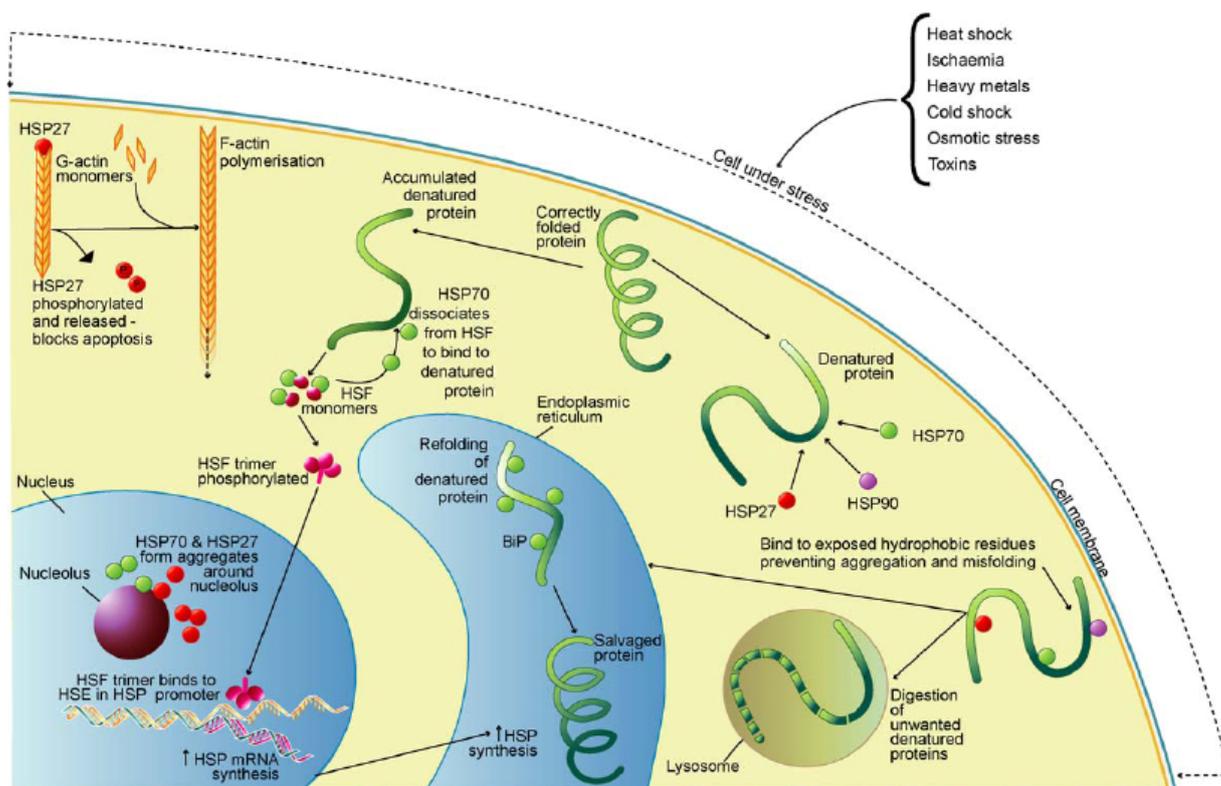


Figure 4: Expression et fonctions des HSP sous un stress d'après Wagstaff

*Lorsque les cellules sont soumises à un stress, l'activation des HSP permet la protection des constituants cellulaires et offre une résistance à l'apoptose dans les limites de l'intensité du stress.(Wagstaff et al. 2007).*

La principale caractéristique de la famille des protéines HSP70 est leur capacité à se lier à des polypeptides naissants. La fonction de cette liaison est d'assurer la conformation tridimensionnelle finale des protéines.

Ainsi, la production de ces protéines est une réponse cellulaire universelle qui permet aux tissus de résister à un stress modéré tel qu'une hyperthermie ou une ischémie.

La possibilité de cette mise en condition tissulaire a ouvert les portes à de nouvelles approches thérapeutiques faisant appel aux capacités d'autodéfense du tissu. Différentes études montrent les implications thérapeutiques d'un choc thermique modéré pour la protection de différents tissus : pulmonaire, neuronal, ou encore cutané (Neschis et al. 1998; Souil et coll. 2001; Kelty et al. 2002; Pespeni et al. 2005)

Après un choc thermique, la synthèse de HSP 72 prévient les dommages causés par un stress ischémique secondaire au niveau du myocarde ou de site de greffe de tissu musculo-cutané en favorisant la reperfusion secondaire (Koenig et coll. 1992; Plumier et coll. 1995; Ito et al. 1999). Ces études démontrent que les HSP 72 préviennent l'altération de la membrane mitochondriale et ainsi préservent l'intégrité de la mitochondrie. Or la dégradation mitochondriale est un signal engendrant l'apoptose, HSP 72 a donc une action sur la régulation apoptotique.

Le développement de ce phénotype de protection requiert des conditions précises (Perdrizet 1997):

1. Un taux d'induction défini. La chaleur est la méthode la plus efficace (hautement contrôlable, reproductible et facilement inductible) pour générer une HSR. C'est pourquoi notre étude s'intéresse à un choc d'origine thermique.
2. Un intervalle de temps défini entre l'exposition à l'agent préconditionnant et la source d'agression secondaire.

Le développement de l'état préconditionnant au niveau cellulaire et tissulaire exige généralement 6-12 heures après l'application du stress (fourchette 2-24 heures) et persiste pendant 2 à 7 jours (1-14 jours). L'ampleur de la protection est directement liée au respect de ces conditions.

Le chapitre suivant expose les données bibliographiques concernant les paramètres nécessaires à cette mise en condition tissulaire.

### **3.3. Préconditionnement tissulaire : Etat de l'Art**

Perdrizet définit deux types de preconditionnement, qui diffèrent selon le protocole d'induction du stress. Le premier résulte d'une exposition cellulaire à un chauffage modéré débuté avant l'agression secondaire et maintenu. A l'inverse, l'état de preconditionnement peut également être obtenu suite à une hyperthermie extrême pour une période très courte, suivi d'une période de récupération avant la lésion secondaire (Perdrizet 1997).

L'analyse de la littérature nous permet de définir les paramètres du traitement nécessaire pour engendrer le preconditionnement. La détermination de ses paramètres constitue une étape essentielle dans la mise en place de notre étude.

En effet, le stress preconditionnant doit répondre à un cahier des charges précis :

1. Un stress homogène du tissu dans toute sa profondeur pour une réponse tissulaire homogène. Ceci implique une absence de contact entre la source de stress et le tissu.
2. Un stress parfaitement maîtrisé. La fenêtre d'action est très ciblée. Aucun dommage tissulaire irréversible ne doit être induit.
3. Un stress quantifiable et reproductible.

C'est pourquoi, nous nous sommes particulièrement intéressés aux états de preconditionnement induit par un choc thermique.

Le tableau ci-après (Tableau 1) présente les paramètres proposés dans la littérature. Leur synthèse nous permettra de définir les paramètres du traitement preconditionnant : intensité et durée du choc thermique.

Tableau 1: Revue de Littérature: Stress thermique préconditionnant et production de HSP

<b>Auteurs</b>	<b>Niveau de chauffage</b>	<b>Durée du chauffage</b>	<b>Tissu étudié</b>	<b>Méthodes &amp; Résultats</b>
(Neschis et al. 1998)	41-42°C hyperthermie du corps entier 8h avant la lésion	15min	Lésion artérielle chez le rat	histologie à J14 et J21: épaissement de l'intima
(Hammerer-Lercher et coll. 2006)	chauffage à 42°C 6h avant la lésion par hypoxie	30min	Artère mammaire interne humaine	surexpression de Hsp72, peu de cellules apoptotiques
Bernadini 2005	chauffage à 42°C 15h avant la lésion	1 h	cellules endothéliales aortiques	Augmentation de la concentration en VEGF et présence de HSP70-32 (western blot).
(Rucker et coll. 2001)	Chauffage local à 42.5°C 24h avant une greffe du lambeau	30 min	Greffe d'un lambeau osteomyocutané sur la patte de rats	HSP32 détecté en immunomarquage
(Yang et coll. 1999)	Chauffage de la température ambiante à 43°C	15min	cerveau de rat	Présence de HSP72 à H+16 (western blot)
(Kelty et al. 2002)	Chauffage local à 40°C (Température de base 30°C)	15min	Tissu neuronal de souris	Présence de HSP72 a H+1-2 (immunoblots)
(Verrico et coll. 2001)	Chauffage local à 43°C	40min	peau de souris	Pic d'expression à 9-24h de HSP47 (western and northern blots)
(Harder et al. 2005)	Chauffage local à 43°C 24h avant la pose d'un greffon ischémique	3x 30min	Greffon myocutané de souris	Surexpression de HSP32 et amélioration de la microcirculation,

(Topping et coll. 2001)	45°C (application sur la peau d'une plaque métallique chauffée) 5h avant une lésion par traitement laser A/37°C B/45°C C/47°C	A/15min B/15min C/15min	peau de souris	A/ pas de Hsp70 B/ expression de HSP70 C/nécrose cellulaire
(Kim et coll. 2004)	45°C par application d'une compresse oculaire (température de base 32°C) 6h avant une photovieablacion au laser	40min	Cornée chez la souris	HSP70: pic d'expression à 6-12h (immunomarquage).
(Nollen et coll. 1999)	A/ 44°C (température de base :37°C) B/43°C C/44°C D/45°C E/46°C	A/ 20min B/30min C/30min D/30min E/30min	Lignées cellulaires clonées	Expression HSP70 liée à la tetracycline /luciferase A/ pic d'expression à 6h B/ Surexpression nucléaire et cytoplasmique C/ Surexpression nucléaire et présence au niveau cytoplasmique, D/ Présence au niveau nucléaire et cytoplasmique E/ Présence uniquement au niveau nucléaire.

(O'Connell-Rodwell et coll. 2004)	A/ 42°C B/ 45°C C/ 50.5°C D/ 51.5°C E/ 53.2°C	A/ 20min B/ 20min C/ 30sec D/30sec E/15sec	Lignées cellulaires	HSP70 luciférase A/ Pic d'expression à 4h B/ pic d'expression entre 6 et 8h C/ pic d'expression à 8h D/ Perte du signal de détection E/ Pas de détection
(Desmettre et coll. 2003)	50°C	1min	tissu chorio-rétinien	Surexpression de HSP 70
(Beckham et coll. 2004)	1) Lésion thermique par laser Ho:YAG (563nm) Température de base:37°C A/ 6J/cm <sup>2</sup> B/9J/cm <sup>2</sup> C/9.6J/cm <sup>2</sup>  2) Chauffage par thermobain A/42°C B/43°C C/44°C D/45°C E/46°C	pendant 10sec     40min 30min 25-40min 15min 15min	une lignée cellulaire fibroblastique modifiée génétiquement Hsp70-luciférase	A/ Surexpression de Hsp70 :8-12h B/ Pic de production C/50% de mort cellulaire  Contrôle de l'expression de Hsp à 8h A/ pas d'expression B/ détection C/ augmentation constante D/ Pic de production E/ Pic de production maximum

(Souil et al. 2001)	Chauffage par traitement 815nm diode laser à 145J/cm <sup>2</sup> (pic à 50°C)	3sec	peau du dos de rat	Surexpression de HSP 70 à 24h
(O'Connell-Rodwell 2008)	100W pulsed laser CO <sub>2</sub> (10.6µm) A/ 1.8J/cm <sup>2</sup> : hausse de température de 23°C B/ 2.7J/cm <sup>2</sup> hausse de température de 25°C C/3.5J/cm <sup>2</sup> hausse de température de 30°C D/4.4J/cm <sup>2</sup> hausse de température de 43°C	1sec	Peau de souris transgénique Hsp70-luciférase	Pic d'expression de hsp70 entre 7-24h après les tirs A&B

Cette revue de littérature met en évidence une relation logarithmique entre la durée, l'intensité du choc thermique et l'induction de l'état de thermotolérance. (Capon et Mordon 2003; Dewhirst, Viglianti et al. 2003; Beckham, Mackanos et al. 2004). Ainsi, une élévation de température dans une fenêtre d'action très ciblée de 10 à 15°C stimule la synthèse des HSP. Cependant, les effets du préconditionnement peuvent également être obtenus pour une montée en température importante sur une période très brève. Toutefois, pour les fortes températures le seuil critique entre l'état de préconditionnement et le dommage irréversible est très étroit et nécessite donc un contrôle rigoureux des paramètres (Dewhirst, Viglianti et al. 2003). Ainsi, il semble que les cellules puissent tolérer des températures extrêmement élevées si les durées d'exposition sont très courtes (de l'ordre de millisecondes).

Notre hypothèse de travail est que cette mise en condition tissulaire existe également au niveau osseux.

La présence de HSP dans le tissu osseux a déjà été démontrée. Ainsi, Tiffée et al. montrent la présence dans l'os de HSP 47, molécule chaperon du collagène de type I, et de HSP 70, protéine inductible par un stress (Tiffée et coll. 2000). HSP 47 est décrite comme molécule constitutive et hautement liée avec les molécules de collagène de type I (principal constituant de la phase organique du tissu osseux) (Nagata 1996). Loones et al. observent l'expression de HSP70 et 90 lors des processus de différenciation cellulaire durant l'ossification d'embryon de souris (Loones et coll. 1998). Comme pour les autres tissus, les HSP jouent un rôle structural et de préservation du tissu osseux.

Toutefois, aucune étude ne porte sur l'application d'un préconditionnement thermique in vivo pour améliorer la cicatrisation du tissu osseux. Les données actuelles ne définissent pas les paramètres requis pour un préconditionnement en site osseux. Le point commun des travaux est que la fenêtre d'action pour induire cette réponse est très étroite. En effet, un stress pas assez intense représente la limite basse et n'aura aucun effet. Et, le stress ne doit pas dépasser le seuil de tolérance, aucun dommage cellulaire et tissulaire irréversible ne doit être induit. La connaissance de cette limite haute est donc indispensable.

### **3.4. Seuil de dénaturation du tissu osseux**

La cinétique d'évolution entre le taux de mort cellulaire et le degré d'hyperthermie est liée par obéit une loi mathématique (relation d'Arrhenius). Celle-ci rend compte de la relation logarithmique qui existe entre le taux de mort cellulaire et le degré d'hyperthermie. La pente de la courbe est typiquement biphasique autour d'un "point de rupture".

Dans une revue de littérature, Dewhirst et al. décrivent ce point de rupture à près de 43°C pour les cellules de rongeurs. Mais, cette étude *in vitro* concerne des lignées cellulaires pour une durée d'exposition au chauffage supérieure à 1 heure. Les auteurs précisent qu'un effet comparable, défini comme étant le même niveau de survie, est observé pour chaque degré d'augmentation de la température avec un temps de chauffage réduit de moitié. (Dewhirst, Viglianti et al. 2003).

L'analyse de la littérature présentée ci-dessous (Tableau 2) s'intéresse au seuil de dénaturation du tissu osseux

Tableau 2: Revue de littérature: Hyperthermie et dommage osseux irréversible

Auteurs	Niveau de chauffage	Durée du chauffage	Tissu étudié	Méthodes & Résultats
(Liebergall et coll. 2000)	Four Microondes (1500W, 2450MHz)  A/ 70°C B/ 70°C C/ 70°C	10sec 20sec 30-90sec	Os de tibia de rats plongés dans une solution saline	Etude de la viabilité cellulaire en histologie (technique de Wolf)  A/ 100% viable B/ 80% viable C/ 100% de mort cellulaire
(Choi et coll. 2001)	laser Nd:YAG 1.32µm  A/ 20W/cm <sup>2</sup> B/ 31W/cm <sup>2</sup>	100sec  A/30sec B/28sec	disque intervertébral de bovin	Etude morphologique et de la perte de poids  A/ changements mineurs B/ mise en ébullition => seuil de dénaturation: 65°C
(Eriksson et coll. 1983)	Chauffage: Montée en température de 15°C	1min	Cellules osseuses de lapin	Dommage irréversible

La cinétique des dommages thermiques est exponentiellement dépendante du degré de montée en température et dépend linéairement de la durée d'exposition ((Moritz, 1947; Beckham, Mackanos et al. 2004)).

### **3.5. Définition de la fenêtre d'action :**

Il existe une remarquable concordance de la sensibilité thermique des différents types de tissus à travers les espèces. Ceci a permis de reprendre les paramètres de température et de durée de chauffage utilisés dans les études présentées ci-dessus et de définir une zone de préconditionnement comme elle le montre la Figure 5.

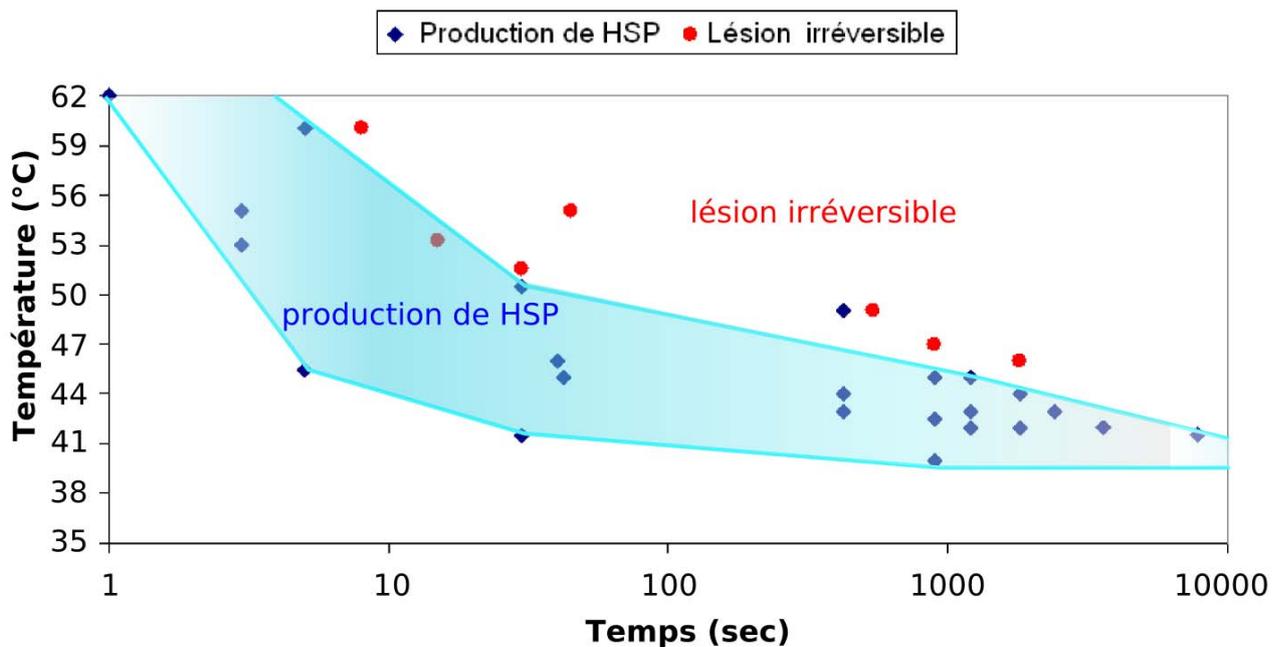


Figure 5 : Courbe d'expression des HSP en fonction du degré et de la durée du chauffage. Cette courbe est obtenue à partir de la revue de littérature exposée ci dessus. Chaque point représente des paramètres expérimentaux déjà étudiés.

La relation température / temps d'exposition a été décrite par la notion de «dose de chaleur». Ainsi un chauffage modéré sur une longue période (par exemple 41,5 °C pendant 130 min) est équivalent à 45,5 °C pendant 7 min 30 sec (Law 1981).

Ces données nous permettent d'appréhender l'organisation spatiale et temporelle de la réponse cellulaire face aux chocs thermiques y compris le seuil de dommage cellulaire

irréversible. Il apparaît évident que pour induire une HSR, une élévation de température contrôlée, homogène est requise et ceci de manière reproductible. Le laser est un système de chauffage finement contrôlable (paramétrage de la longueur d'onde, de la taille du spot, de la durée d'impulsion et d'exposition) et pour ces raisons répondant très bien à notre cahier des charges (Souil et al. 2001).

Il est maintenant accepté que la HSR n'est pas seulement un témoin de l'action biologique de la génération de chaleur, mais aussi une partie du mécanisme de l'action thérapeutique des lasers thermiques (Capon et Mordon 2003).

Le laser est actuellement indiqué dans de nombreuses applications chirurgicales : ophtalmologie, chirurgie vasculaire ou esthétique. Il existe un panel important de lasers. Chacun engendre un effet biologique défini en fonction d'une part, de la longueur d'onde de son faisceau, la puissance et la durée du tir et, d'autre part, des caractéristiques physico-chimiques du tissu cible et de la surface traitée. Ainsi, le laser induit une énergie paramétrable et reproductible.

Plus récemment, le laser a été appliqué comme traitement préconditionnant sur des lignées cellulaires osseuses. Ainsi, pour O'Connell-Rodwell et al., la viabilité cellulaire est maximale pour un préconditionnement à 50°C pendant 30 secondes avant une seconde agression. Ces résultats sont retrouvés pour une température plus élevée (53 à 55°C) pour une durée plus brève (15 à 20 sec) (O'Connell-Rodwell et al. 2004). Or, le seuil de survie des cellules osseuses correspond à une augmentation de température de 15°C d'amplitude pour une durée maximale de 1 minute (Eriksson and Albrektsson 1983).

L'objet de notre étude est d'observer les effets d'un traitement thermique préconditionnant sur la cicatrisation osseuse. Par conséquent, pour ce faire, un certain nombre d'éléments doit être mis en place :

1. Le choix du laser et son paramétrage constituent une étape essentielle de notre étude. Une étude préliminaire permet de déterminer les paramètres optimaux du laser (puissance et temps d'exposition) pour induire une augmentation contrôlée de la température de l'ordre de 15°C.
2. Comme nous l'avons vu, la réparation osseuse est dépendante de la vascularisation. La mise au point d'un modèle original animal a pour but l'étude de la vascularisation sur le long terme comme paramètre de cicatrisation osseuse.
3. Une méthode de lésion osseuse reproductible et contrôlée appliquée après le traitement préconditionnant doit également être mise en place.
4. Une technique d'immunohistologie applicable sur le tissu osseux afin de mettre en évidence la présence de HSP produite après l'application d'un stress supraphysiologique.

Ce travail a pour but d'évaluer les effets d'un traitement laser thermique sur la physiologie de la cicatrisation osseuse.

L'objectif final est la mise au point d'une technique simple, fiable et reproductible favorisant la cicatrisation osseuse après chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, pose d'implants dentaires, en utilisant les capacités d'autoprotection du tissu osseux. Cette technique innovante offre la perspective d'accélérer et de favoriser la cicatrisation osseuse après une chirurgie programmée. Cette stimulation préimplantaire offre la possibilité d'une mise en condition tissulaire stimulant l'ostéointégration et limitant ainsi le retard ou l'absence de cicatrisation.

**4. DE L'IDEE A LA PRATIQUE : CHOIX ET MISE EN  
SCENE DES ACTEURS**

## **4.1. Modèle de cicatrisation osseuse**

### **4.1.1. Intérêts du modèle animal :**

Les études visant à analyser l'os en cours de cicatrisation doivent respecter les interactions intra tissulaires complexes et plus particulièrement celles qui existent entre les cellules osseuses et la vascularisation. Les études *in vitro* ne respectent pas ces conditions puisqu'elles font abstraction de l'environnement. Les études *in vivo* étudient la biologie des cellules en situation. Intégrées dans leur système, les réponses observées prennent en compte la participation des facteurs de croissance et des hormones. Seules ces techniques permettent l'étude d'un processus dynamique complexe tel que les paramètres fonctionnels et structuraux de la microcirculation osseuse dans un environnement proche de la situation physiologique. Ainsi, la qualité de la cicatrisation du tissu osseux peut être étudiée au travers l'évolution de son réseau vasculaire (Winet 1996).

Un modèle animal a été développé dans le but de suivre l'intégration de biomatériaux au niveau osseux. Il est basé sur l'implantation d'une chambre optique sur la calvaria du lapin (Figure 6) (Penel et coll. 2005). Il a été adapté pour notre étude au suivi des événements vasculaires dynamiques en site osseux.

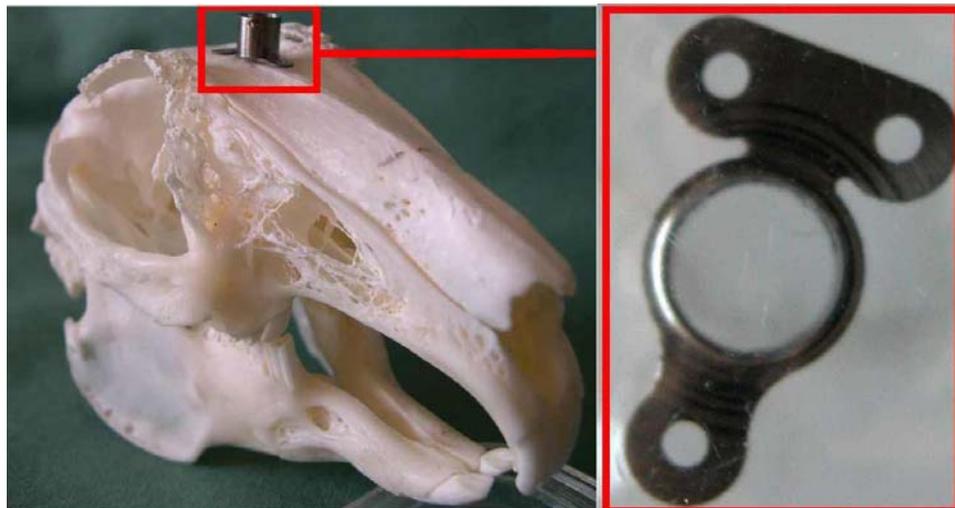


Figure 6: Chambre optique et son site d'implantation

*La chambre optique est constituée d'un cylindre de titane, d'une vitre en silice et des 2 pattes permettant la fixation par 3 vis d'ostéosynthèse sur la calvaria osseuse.*

De plus, l'analyse *in vivo* développée dans cette étude permet le suivi longitudinal d'un même site chez le même animal. L'animal est son propre témoin.

### **4.1.2.Choix du site d'implantation**

La plupart des modèles connus s'intéressent aux os longs. Il existe cependant une spécificité des os cranio-faciaux (cf. chap .2), d'où la nécessité de développer notre propre modèle.

L'observation régulière au long terme d'un os membraneux impose cependant un certain nombre de contraintes:

- La zone d'implantation de taille et d'épaisseur suffisantes pour permettre la pose d'une chambre d'observation et d'un moyen de fixation du système d'enregistrement des données de manière reproductible,
- Une zone facile d'accès permettant une chirurgie peu invasive et reproductible, limitant les risques de complications.
- Un système bien toléré par l'animal, facilement intégré dans sa vie quotidienne
- une facilité d'accès pour l'enregistrement des données et sans prémédication afin d'être le plus proche possible des conditions physiologiques et de pouvoir renouveler l'enregistrement des données « à volonté »

La calvaria répond à ces critères, os membraneux plat, sa surface et sa situation anatomique la rendent facile d'accès. De plus, d'un point de vue pratique, la chambre optique implantée entre les deux yeux, ne présente pas de gêne fonctionnelle, est très bien tolérée et non douloureuse.

=> **L'implantation est donc réalisée sur la calvaria, centrée entre les deux orbites.**

## **4.2. Laser et tissu osseux**

### **4.2.1.Le laser : définition et caractéristiques**

Le mot Laser est un acronyme qui signifie « Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation » : amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement.

Lorsque de l'énergie est appliquée sur une substance émissive active, des électrons sont libérés. Pour revenir à un état désactivé l'électron produit un photon. Lorsque ce dernier

rencontre un atome ou une autre molécule à l'état excité, l'interaction aboutit à l'émission d'un photon rigoureusement en phase avec le premier. Si l'onde formée avec ces deux photons rencontre un autre atome excité, le même phénomène se reproduit. Ces interactions successives donnent alors naissance à une lumière cohérente (Duchêne 2001)

Cette émission nécessite 3 éléments fondamentaux (Duchêne 2001; Mordon 2007):

- une substance émissive active (solide, gaz, colorant, semi-conducteur, etc.),
- un dispositif d'excitation (dit aussi de pompage) des atomes ou de molécules du milieu actif. Il constitue un apport extérieur d'énergie à l'origine du même état excité.
- Une cavité de résonance dont le but est une amplification de l'émission de photons et donc de la densité de la lumière. Cette cavité est constituée de deux miroirs placés de part et d'autre de la substance émissive. Ils multiplient artificiellement les rencontres entre les photons et les atomes excités. L'un de ces miroirs semi-transparent permet la sortie du faisceau. Cette émission lumineuse intense et cohérente définit l'effet laser.

Le système diode laser répond à des caractéristiques particulières :

Une diode laser est une jonction de semi-conducteurs comme l'illustre la Figure 7. La zone active est formée d'un ensemble de mono émetteurs excités par un courant électrique. Le zone active excitée par un courant électrique produit une région P (milieu semi conducteur positif perd des électrons instables et excités) et une région N (milieu semi conducteur négatif, qui reçoit les électrons), entre les deux des photons sont libérés. C'est la distance entre la zone N et P qui détermine la longueur d'onde du faisceau photonique émis Ces mono émetteurs jouent le rôle de miroirs semi réfléchissants, créant la cavité résonante. Les couches de confinement entourant la diode permettent d'optimiser l'utilisation du courant dans la diode et d'augmenter le rendement.

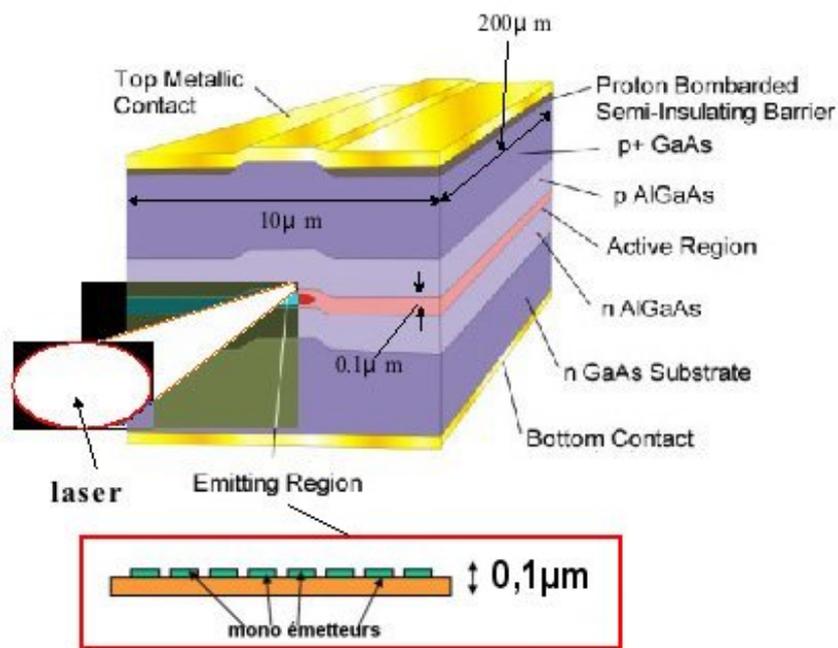


Figure 7: Système diode laser

La variété des applications du rayonnement laser s'explique par ses caractéristiques exceptionnelles: monochromaticité (choix de la longueur d'onde), cohérence spatiale et temporelle. Cette émission dans une seule direction permet d'obtenir une tache lumineuse d'intensité et de diamètre de spot contrôlés très précisément. En tant qu'instrument laser médical, le laser se définit selon 4 caractéristiques principales :

- Sa longueur d'onde d'émission ;
- Sa puissance (ou son intensité) ;
- Sa durée d'émission ;
- La forme et la taille de son faisceau.

#### 4.2.2. Interaction Laser- Tissu osseux

Contrairement aux autres moyens de chauffage, le laser permet un chauffage des tissus sans contact. De plus, la distribution de la chaleur est connue et reproductible. Ceci permet d'ailleurs une modélisation de la distribution de la chaleur grâce à un modèle mathématique comme nous le verrons au chap.6.2.2.

L'action thermique des lasers repose sur l'initiation d'une source de chaleur au niveau tissulaire, conduisant à une élévation de température dont l'amplitude et le temps pendant lequel le chauffage est maintenu conditionnent l'action tissulaire. Il est possible de distinguer 3 étapes décrites entre autres par Mordon et présentées dans la Figure 8 (Mordon 1995):

- La conversion en chaleur de la lumière émise par le faisceau laser,

- Le transfert de cette chaleur dans les tissus,
- La réaction thermo-chimique des constituants tissulaires.

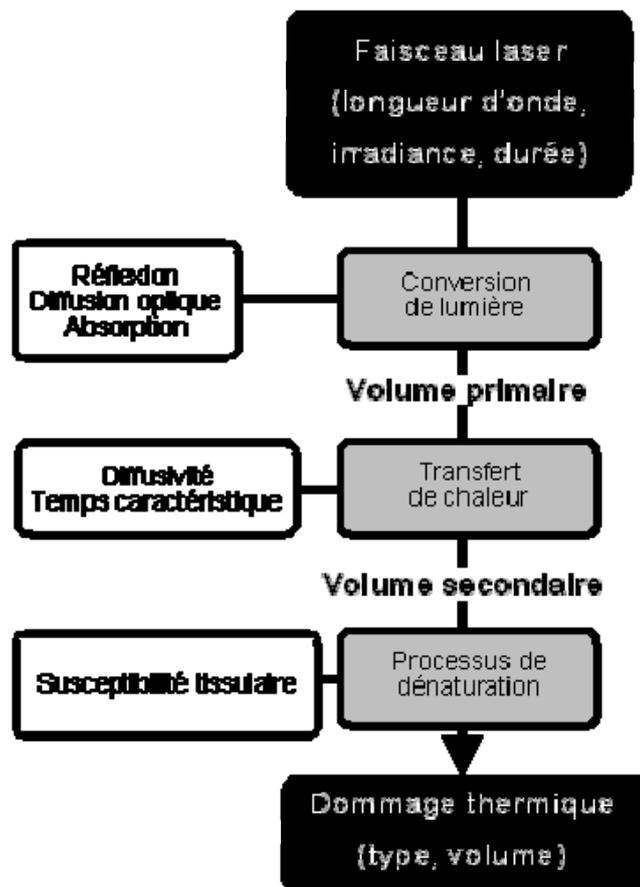


Figure 8: Schéma des 3 étapes de l'action thermique du tir laser

#### 4.2.3. Création de la source de chaleur : longueur d'onde et diamètre du spot

La source de chaleur est induite par conversion de la lumière laser.

Le principe est le suivant : le faisceau laser délivre une énergie photonique. Elle se transfère par conversion à une molécule qui passe alors à un niveau d'énergie supérieur, appelé vibrationnel. Puis, il y a collision avec une autre molécule et augmentation de son énergie cinétique. La répétition de ce phénomène induit une augmentation locale de la température tissulaire.

Cette énergie est distribuée spatialement en fonction des paramètres du laser mais aussi des coefficients optiques du tissu. Ainsi, avant même l'absorption du faisceau, la réflexion

optique à la surface du tissu va limiter l'efficacité du laser. Cette réflexion optique est limitée (de l'ordre de 5 - 10%) pour les longueurs d'onde comprises dans l'infrarouge. Le faisceau est ensuite absorbé par les différentes molécules du milieu.

#### 4.2.3.1. Choix de la longueur d'onde

Nous cherchons à chauffer la calvaria qui est un tissu osseux superficiel et d'environ 2 mm d'épaisseur. Pour cela, le faisceau laser doit être peu pénétrant afin de chauffer le tissu osseux sans léser le tissu cérébral sous jacent. L'absorption de cette énergie photonique est fonction du couple longueur d'onde du faisceau / caractéristiques physico-chimiques du chromophore.

La zone comprise entre 600 et 1100 nm correspond à une absorption faible est donc la plus propice à une illumination en profondeur. C'est plus particulièrement la zone 750 - 900 nm qui a la plus faible absorption comme le montre le spectre d'absorption des principaux chromophores des tissus calcifiés (Figure 9).

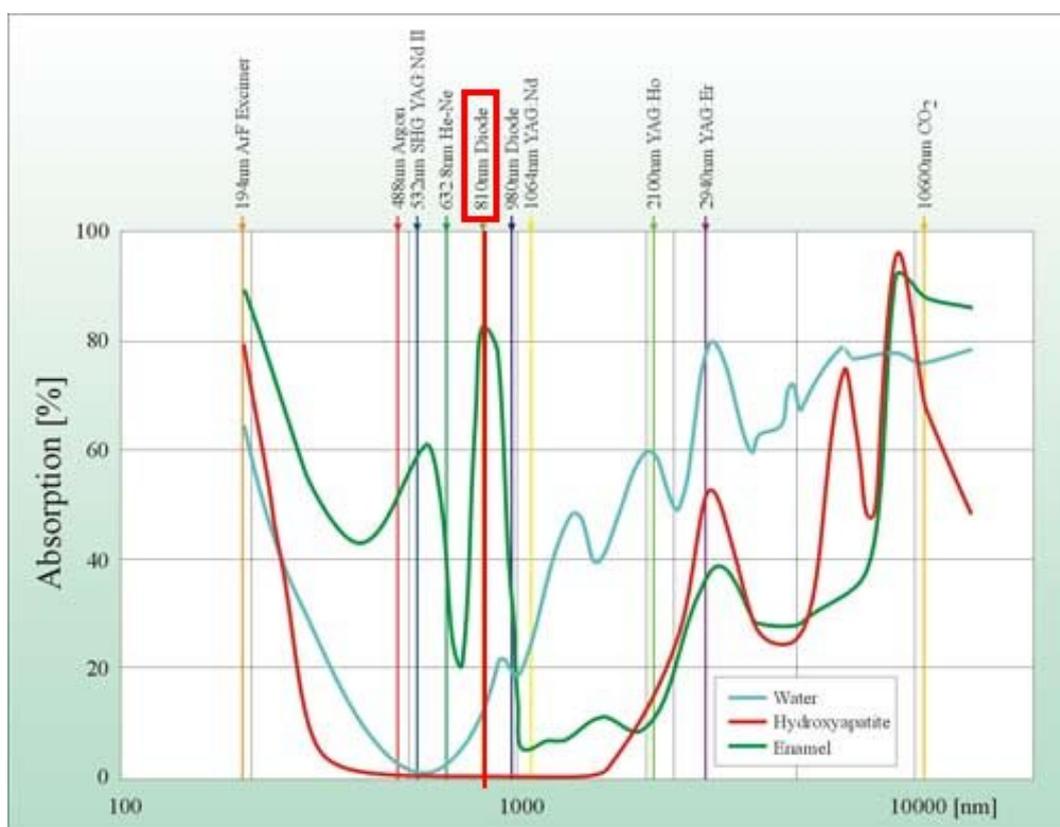


Figure 9: Spectre d'absorption des principaux chromophores des tissus calcifiés adapté d'après Pokora (Pokora, 2007)

Cependant, les tissus vivants très hétérogènes ne sont pas un milieu optique idéal, il existe donc un phénomène de diffusion optique. Celui-ci induit de multiples modifications de trajectoires liées aux réflexions, réfractions et diffractions. Ce phénomène contribue à l'extinction du faisceau (c'est-à-dire la conversion de tous les photons dans une autre énergie).

Dans l'ultraviolet court et dans l'infrarouge lointain, l'absorption est plus importante que la diffusion. Dans les autres parties du spectre, la diffusion influence la distribution du faisceau dans le tissu. Ainsi, l'atténuation totale du faisceau dépend à la fois du coefficient d'absorption ( $\mu_a$ ) et du coefficient de diffusion ( $\mu_s$ ) du tissu cible. C'est pourquoi, il faut considérer le coefficient de diffusion optique ( $\mu_s$ ) de l'os.

En raison de ses nombreux différents composants, l'os a un très large spectre d'absorption (Krause et coll. 1997). La profondeur de pénétration du faisceau dans le tissu osseux dépend des paramètres optiques du tissu. D'après les travaux de Firbank (Firbank et coll. 1993), le coefficient d'absorption ( $\mu_a$ ) de la calvaria de porc est de  $0.025 \text{ mm}^{-1}$ , et le coefficient de diffusion ( $\mu_s$ ) de  $2 \text{ mm}^{-1}$ .

La profondeur de pénétration ( $\delta$ ) de ce faisceau dans la corticale osseuse est calculée selon la formule suivante :

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}}$$

où  $\mu'_s$  est le coefficient de diffusion réduit :  $\mu'_s = \mu_s (1-g)$  avec  $g = 0.945$ .

La profondeur de pénétration dans l'os pour une longueur d'onde de 815 nm est donc de 1,92 mm. Ugryumova et al. proposent un coefficient d'absorption ( $\mu_a$ ) de  $0.023 \text{ mm}^{-1}$ , et un coefficient de diffusion ( $\mu_s$ ) de  $2.1 \text{ mm}^{-1}$ , soit une profondeur de pénétration de 2 mm (Ugryumova et coll. 2004).

L'énergie photonique du système laser 815 nm est fortement absorbée par l'os et sa profondeur de pénétration est faible.

**=> Le système diode laser à une longueur d'onde de 815 nm est donc retenu pour notre étude.**

#### 4.2.3.2. Choix du diamètre du spot

Le diamètre du spot est imposé par les caractéristiques techniques de notre modèle d'observation *in vivo*. Notre fenêtre d'observation a un diamètre de 5 mm, le diamètre du spot doit donc lui être inférieur.

De plus, si la lumière à 815 nm pénètre jusqu'à 2 mm, avec un maximum de température en profondeur, soit dans notre contexte idéalement situé au centre de la calvaria (Figure 10)

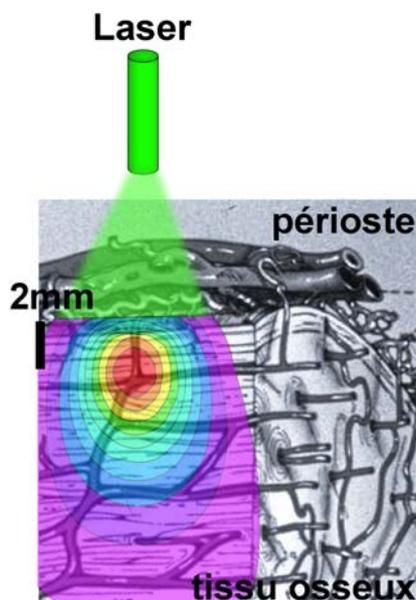


Figure 10: Diffusion du faisceau laser au sein du tissu osseux adaptée d'après les travaux de Reinisch qui présentent la diffusion thermique dans le tissu cutané. (Reinisch 2002)

Cette pénétration est également dépendante du diamètre du spot. En effet, le profil de distribution de l'énergie laser est de type gaussien. C'est à dire qu'il existe un pic de température au centre du spot et que la température décroît proportionnellement à l'éloignement du centre du spot (Chen et coll. 1987). Pour obtenir un effet homogène, le diamètre du spot doit donc être limité.

=> **Ainsi, le diamètre du spot est fixé à 4 mm.**

#### **4.2.4. Transfert de la chaleur et effet biologique: Détermination de la durée du tir laser**

Le transfert de la chaleur, seconde étape de l'effet thermique du laser sur les tissus, joue un rôle essentiel. Il conditionne en grande partie l'importance de l'action thermique du laser par la création de gradients de température au sein du tissu. En effet, les tissus vivants sont capables de transformer une grande partie d'énergie sous forme de chaleur, car le maintien d'une température spécifique conditionne la vie tissulaire. Il existe deux grands mécanismes de transfert de la chaleur dans les tissus biologiques: la convection et la conduction.

1. La convection de chaleur signifie un transport de masse, alors que la conduction de chaleur est caractérisée par un transport de chaleur sans transport de masse. Dans le cas d'une irradiation laser, le transfert de chaleur via les vaisseaux sanguins, généralement considérés comme vecteur important du transfert par convection, n'intervient pas pour des durées de chauffage inférieures à une dizaine de secondes et par conséquent aucune convection n'apparaît (Svaasand et coll. 1985).
2. La conduction de chaleur est donc le mécanisme prédominant qui intervient par interaction des particules du tissu. Ce transfert s'effectue aléatoirement des particules les plus énergétiques à celles qui le sont moins. Ce transfert dépend des coefficients thermiques du tissu. La capacité qu'a un tissu à transporter de l'énergie par conduction est caractérisée par un état stationnaire qui est la conductivité thermique et un état transitoire qui est la diffusivité thermique.

Comme nous l'avons décrit précédemment, le préconditionnement répond à des critères de chauffage précis. L'un des prés requis indispensables est un chauffage homogène du tissu. Si le transport de la chaleur est un élément clé du mode de chauffage, la diffusivité thermique introduit également la notion de temps de relaxation thermique (TRT) qui doit également être prise en compte.

Ce temps correspond à la durée nécessaire pour qu'il y ait un transfert d'énergie en dehors de la cible, permettant d'obtenir au centre de la source une diminution de la température à une valeur équivalente à 50% de la valeur maximale atteinte. La conséquence directe de ce transfert de chaleur est donc le refroidissement de la cible, et une élévation de température des tissus adjacents à la cible. Ce terme dépend des dimensions de la cible (en substance la source de chaleur) et de son volume (Choi et al. 2001).

Il est exprimé par l'équation suivante :

$$\text{TRT} = \frac{D^2}{C \times k}$$

où,

D= diamètre du spot ;

C dépend de la géométrie de la cible : dans le cas d'une sphère C=27 ;

k= diffusivité thermique.

La diffusivité thermique en site osseux est estimée à  $5 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$  (Haupt et coll. 1996; Rodríguez 2001). La diffusivité thermique du sang est de  $1.7 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ .

La conversion de lumière conduit à une source de chaleur dont les dimensions sont tout d'abord déterminées par la cible. La zone affectée thermiquement dépend de l'expansion de cette source de chaleur. Cette expansion dépend du temps d'impulsion vis à vis du temps de relaxation thermique de la cible. Si le temps d'impulsion du laser est de l'ordre du temps de relaxation thermique de la cible, la zone affectée thermiquement est sensiblement équivalente à la source de chaleur. Dans ce cas, on obtient uniquement un effet thermique dont l'intensité est modulée par l'intensité de la source de chaleur. Si on applique l'équation précédente, le temps de relaxation thermique en milieu osseux est de 1,2 secondes et de 3,5 secondes pour le sang.  
**=>Un temps de tir de 3 secondes apparaît donc bien adapté à notre étude.**

Ainsi, le tir laser génère une source de chaleur dont les dimensions sont connues et fonction de la durée et de l'intensité de l'impulsion. La zone affectée thermiquement dépend ensuite de l'expansion de cette source de chaleur.

Après la création de la source de chaleur et son transfert, la troisième étape de l'action thermique du tir laser est l'étape thermochimique qui conduit à l'effet biologique. Ce dernier est sous l'influence directe de la fluence appliquée (quantité d'énergie appliquée par unité de surface ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )). Si le paramétrage de cette dernière n'est pas correct, la réponse biologique tissulaire sera nulle ou de type dommage tissulaire avec une dénaturation ou une destruction du tissu. A énergie équivalente, les conséquences tissulaires diffèrent selon la durée de l'impulsion. L'impulsion laser est caractérisée par son irradiance (puissance du tir par unité de surface du spot ( $\text{W}/\text{cm}^2$ )) et sa fluence.

La puissance du tir laser est donc le dernier paramètre à définir. Elle nécessite une étude des variations de température de la masse osseuse en fonction de la puissance du tir.

Cette expérimentation est présentée dans les chapitres suivants 5.4 et 6.2.

### **4.3. Lésion secondaire induite : irradiation par rayons X**

#### **4.3.1. Effets des rayons X sur le tissu osseux**

L'irradiation par rayons X engendre des effets immédiats et retardés aigus sur les tissus et l'os dans le secteur exposé.

Ces dommages se caractérisent par une diminution définitive des capacités de cicatrisation du tissu osseux, avec une altération de la vascularisation et la mise en place d'une fibrose tissulaire. Ils ont été décrits au niveau histologique comme une raréfaction cellulaire, une fibrose tissulaire et une réduction de la densité vasculaire avec un rétrécissement marqué des petits vaisseaux sanguins. Ainsi, on observe une réduction du flux sanguin dans les canaux de Havers et de Volkmann induisant une hypoxie et à plus long terme une réduction de la densité minérale osseuse (Dische 2001). King et Casarett classent les effets de la radiothérapie sur le tissu osseux sain en 4 phases (King et coll. 1979):

1. Phase I : Développement d'un dommage cellulaire et tissulaire initial sévère, altération du réseau vasculaire le plus fin.
2. Phase II : Mise en évidence d'un processus de cicatrisation atypique avec persistance de zones tissulaires nécrotiques et apparition d'un tissu cicatriciel fibreux et fibrose des capillaires.
3. Phase III : Phase intermédiaire : dégénérescence de la microvascularisation et progression de la fibrose interstitielle.
4. Phase IV : Hypoplasie et atrophie tissulaire prématurée pouvant engendrer dans les formes les plus sévères une nécrose également appelée ostéoradionécrose.

Dans le cadre des traitements des tumeurs malignes de la tête et du cou, un des effets secondaires de la radiothérapie est le développement d'une ostéoradionécrose préférentiellement localisée au niveau de la mandibule (Mendes et coll. 2002). Cette dernière est décrite en pratique clinique comme un os mandibulaire nécrosé et détaché des tissus mous environnants, exposé dans la cavité buccale. L'hypothèse étiologique couramment admise définit un effet chronique des rayons X sur l'os caractérisé par Marx dès 1983 par « le principe des trois H »: hypovascularisation, hypocellularité et hypoxie (Marx 1983).

Ainsi, le tissu irradié se caractérise par une absence de revascularisation spontanée suite à une blessure. La lésion en site irradié est alors diffuse et progressive ; elle n'est pas

reconnue comme une agression par l'organisme et donc la cascade de cicatrisation physiologique décrite dans le chapitre 2 n'est pas mise en place (Marx et coll. 1987).

Cette conséquence extrême de l'irradiation par rayons X illustre parfaitement le caractère délétère constant des rayons X sur le processus de cicatrisation osseuse. Les modifications histologiques de l'os irradié sont le résultat d'un processus biologique retardé suite aux effets combinés du rayonnement sur les cellules osseuses et le réseau vasculaire. L'effet antiangiogénique est sévère et prolongé. L'importance de la lésion créée est dépendante de la dose d'irradiation (Okunieff et coll. 1998).

Lors d'une étude sur les effets de la radiothérapie sur la microvascularisation mandibulaire sur 128 cochons, Xie et al. retrouvent une discontinuité du réseau vasculaire et une oblitération des capillaires avec un rétrécissement des vaisseaux qui s'aggravent au cours du temps (Xie et coll. 1998). Ces données sont confirmées par Muhonen et al. qui ont travaillé sur des lapins ayant subi une irradiation mandibulaire (Muhonen et coll. 2004).

L'irradiation par rayons X a donc des effets antiangiogéniques et fibrogéniques sévères qui altèrent la qualité du tissu osseux. Elle semble donc un moyen de lésion fiable, quantifiable et hautement reproductible. Elle répond donc aux objectifs de notre étude et a été choisie comme moyen de lésion secondaire pour son caractère quantifiable, reproductible et applicable au travers la chambre optique.

### **4.3.2. Paramétrage de l'irradiation par rayons X**

#### **4.3.2.1. Atténuation du rayonnement X en milieu osseux**

L'atténuation du rayonnement X dans la matière a été décrite dans (International Atomic Energy Agency 2005). Les photons interagissent avec les atomes selon différentes possibilités dépendantes de deux données : l'énergie du photon et le numéro atomique de la matière.

Ainsi, la dose distribuée dans la matière répond à cette équation :

$$D = D_0 e^{-\mu x}$$

$D_0$  = dose initiale

$x$  = épaisseur du tissu (en considérant que la densité de l'os est égale à la densité de l'eau = 1)

$\mu$  = coefficient d'atténuation.

Le coefficient d'atténuation est la résultante de 4 effets :

1. L'effet Rayleigh se définit comme l'interaction des photons avec un électron orbital sans atteindre le noyau, il n'y a donc pas de transfert d'énergie. En radiothérapie, cet effet est négligeable.
2. L'effet Photoélectrique est égal au numéro atomique des molécules à la puissance 3. Il est également inversement proportionnel à l'énergie du tube à rayons X. Cet effet est très important lors de l'utilisation des tubes à rayons X de basse énergie.
3. L'effet Compton correspond à l'énergie qui déplace la molécule et s'accompagne de l'émission d'un photon. Il est égal au numéro atomique des molécules
4. L'effet Coulomb est défini comme étant l'énergie d'un photon permettant de créer une paire : électron/positron. Le minimum d'énergie requis pour observer cet effet est égal  $2mc^2$  soit 1,02 MeV. Cet effet est donc également négligeable en radiothérapie, car l'énergie délivrée est inférieure à 1,02 MeV.

Dans le cadre d'un rayonnement X utilisé en radiothérapie, le coefficient d'atténuation est donc fonction de l'effet photoélectrique et de l'effet Compton.

Les numéros atomiques des molécules de l'os sont compris entre 1 et 1,3 avec une moyenne de 1,1. Les effets photoélectrique et Compton étant directement proportionnels à cette valeur, ils sont donc négligeables. Nous pouvons donc conclure que l'hétérogénéité de la structure osseuse n'influence pas l'absorption de la dose et que l'atténuation est uniquement fonction de l'épaisseur du tissu.

#### **4.3.2.2. Choix du type de rayonnement X**

Il existe différents types de tubes à rayons X caractérisés par la puissance de leurs faisceaux. Pour les tubes Cobalt ou les rayonnements à haute énergie (Linac : accélérateur de particules) la distribution répond au modèle suivant (Figure 11) :

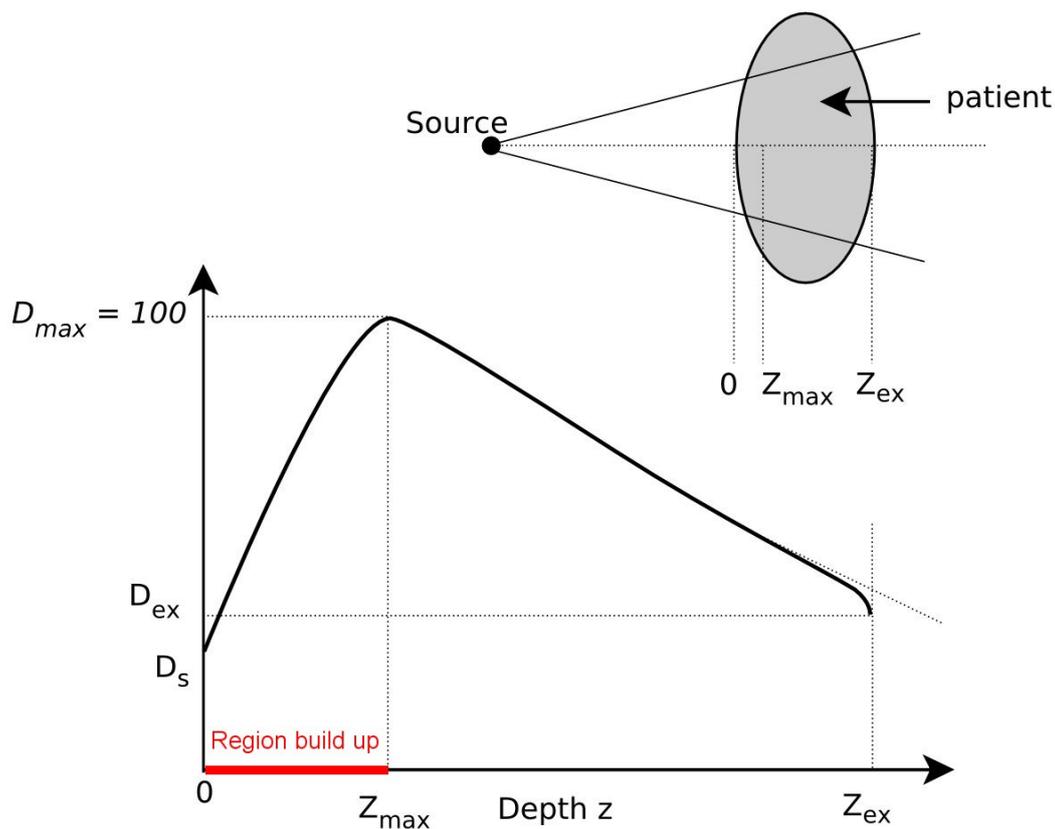


Figure 11: Distribution d'un rayonnement haute énergie sur un patient

Courbe adaptée d'après l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (International Atomic Energy Agency 2005). Où,  $D_s$  est la dose distribuée en surface à l'entrée du faisceau,  $D_{ex}$  la dose distribuée en surface en sortie de faisceau, et  $D_{max}$  la dose maximale distribuée (le plus souvent normalisée à la valeur 100).

La courbe de distribution de la dose est donc fonction de l'épaisseur ( $Z$ ) du tissu traversé et est la résultante en pourcentage de la dose maximale ( $D_{max}$ ). La région entre  $Z=0$  et  $Z_{max}$  (épaisseur à laquelle la dose distribuée est maximale) est définie en tant que « dose build up region ». Cette région fait référence à une zone d'accumulation de particules chargées (électrons et positons) qui sont libérés en partie sous forme d'interactions de photons (effet photoélectrique, effet Compton). Dans cette zone, l'équilibre électronique n'est pas atteint et par conséquent la dose réelle distribuée n'est pas connue. Dans la zone située au-delà de  $Z_{max}$ , l'équilibre électronique est atteint, les effets photoélectrique et de Compton sont négligeables, la dose déposée sous forme d'énergie cinétique est alors connue.

La dose délivrée devant être maîtrisée de manière très rigoureuse, le protocole de radiothérapie exige de toujours travailler au-delà de cette zone.

Cette « dose build up region » est connue et varie en fonction des tubes, ainsi la courbe d'atténuation dans l'eau (l'os est assimilé équivalent) est :

Pour un tube cobalt (1MeV) :  $Z_{max}= 5\text{mm}$

Pour Linac 10MeV,  $Z_{max}= 25\text{mm}$

Pour Linac 25MeV,  $Z_{max}= 40\text{mm}$

Dans le cadre de notre étude, nous cherchons à léser un os superficiel d'une épaisseur de 2 à 3 mm. Notre modèle d'étude nécessite donc une irradiation en surface qui se situe donc dans la « dose build up region » où la distribution exacte est inconnue. Les tubes à rayonnements de haute énergie ne sont donc pas indiqués.

La distribution d'un tube à rayons X de faible énergie suit une courbe totalement différente puisqu'elle est maximale en surface d'entrée de faisceau et suit une diminution exponentielle en fonction de l'épaisseur sans zone de « dose region build up » comme le montre la Figure 12ci après :

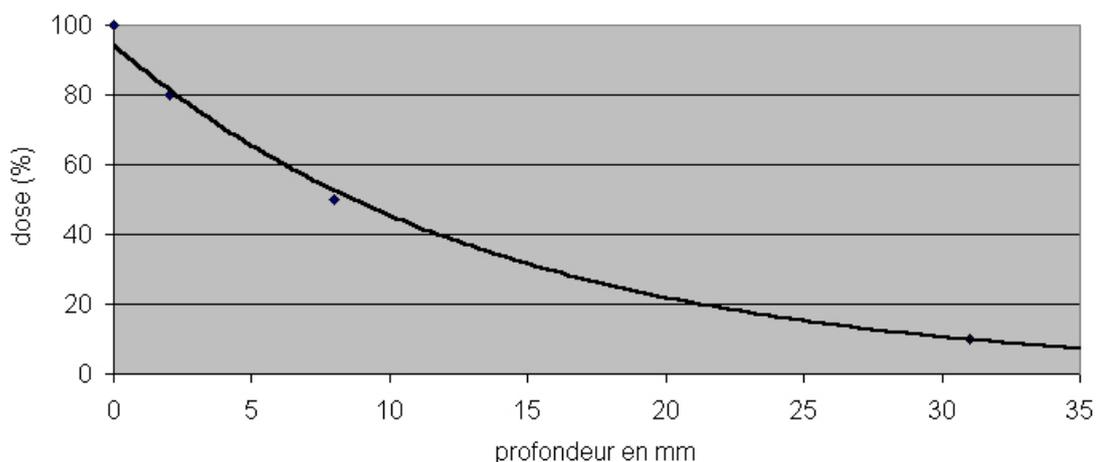


Figure 12: Distribution du rayonnement X à faible énergie dans les tissus.

Courbe réalisée à partir des données du fabricant

*Darpac 2000*<sup>®</sup> (Gulmay Medical, Surrey, Angleterre).

Ce protocole est indiqué pour les irradiations superficielles (rayonnement peu pénétrant) et de petite étendue. Il est couramment utilisé pour le traitement des lésions cancéreuses dermatologiques et pour les radiothérapies des petits animaux.

**=> Un tube à rayons X de faible énergie est retenu pour irradier la calvaria.**

Concernant la dose à appliquer pour induire une lésion, notre protocole se base sur les travaux de Arnold et al.(Arnold et coll. 1998). Leur étude est une observation des retards de

cicatrisation osseuse radio-induits sur des fémurs de rats. Ils indiquent qu'une irradiation par rayons X préopératoire avant un forage osseux engendre un retard de cicatrisation et un défaut de remodelage pour une dose de 15 Gy. Ils définissent un seuil de non récupération *ad integrum* pour une dose de 15 Gy .

**=> C'est pourquoi, une dose 18.75Gy en surface est définie pour induire une lésion osseuse équivalente à 15 Gy à 2mm de profondeur.**

#### **4.4. Analyse immunohistologique.**

Notre hypothèse de travail est que le traitement laser pourrait induire une mise en condition tissulaire définie « Heat Shock Response » comme un changement rapide et transitoire du métabolisme cellulaire (Perdrizet 1997). Une approche immunohistochemique visant à étudier l'expression des HSP surexprimées après un choc thermique est retenue pour valider notre hypothèse.

Pour cela nous souhaitons mettre en évidence la présence de HSP en milieu osseux comme cela a déjà été montré (Tiffée et al. 2000; Leucht et coll. 2007). Dans un premier temps, il nous faut mettre au point la technique d'immunomarquage.

Toute la difficulté de cette analyse réside dans la mise au point d'un protocole de décalcification et de coupe du tissu osseux sans détérioration des épitopes. L'idéal est la congélation du prélèvement et sa coupe sans décalcification. Cependant, n'ayant pas accès à ces techniques très spécifiques peu développées, cette option est donc abandonnée. Afin de conserver l'immunoréactivité du tissu osseux, de nombreux essais sont effectués. Ces travaux ont été réalisés au laboratoire d'histologie par MH GEVEART et au laboratoire INSERM ERI-9, EA 2693, par A. UNG, CHRU, Lille. Les protocoles sont résumés dans le Tableau 3 et Tableau 4.

L'analyse immunohistologique nécessite la validation de nombreuses étapes:

1. La décalcification: la qualité de la coupe est validée par une coloration de routine HES (Eosine - Hématoxyline - Safran)
2. L'immunoréactivité des coupes : ceci est testé par un marquage de routine des cellules endothéliales par un anti-CD31
3. La technique d'immunomarquage des HSP est quant à elle validée par un marquage de HSP47 : HSP constitutive et hautement liée au collagène de type I présent dans l'os.

4. Notre objectif final est l'immunomarquage visant à mettre en évidence la présence de HSP 70 dont la production est induite par le préconditionnement laser.

Pour ces essais, les lapins sont anesthésiés par injection sous cutanée de médétomidine (*Rompun*<sup>®</sup>) 0.1/100 ml à 500 µg/kg et d'une injection intramusculaire de kétamine (*Imalgène*<sup>®</sup>) 50 mg/ml à 25 mg/kg. Puis ils sont sacrifiés par l'injection intraveineuse de 0.3 ml/kg Tanax T-61 (Tanax ; Aventis, Strasbourg, France).

La calvaria est prélevée et fixée dans du paraformaline 4% pendant 24h.

Puis différents protocoles de décalcification sont testés sur plusieurs échantillons, ils sont présentés ci-dessous.

1. La première étape consiste à mettre au point un protocole d'inclusion, de décalcification et de coupe du tissu en préservant son immunoréactivité. Un groupe est inclus dans un bloc de paraffine avant d'être décalcifié, le second est décalcifié avant son inclusion. La décalcification est obtenue avec de EDTA, du RDO ou de l'acide nitrique : la concentration et le temps sont variables.

Tableau 3: Echantillons inclus en paraffine avant d'être décalcifiés

	15min	18min	20min	45min	60min	24h	48h
EDTA 5%	-	-	-	-	-	-	-
EDTA 10%	-	-	-	-	-	-	-
EDTA 15%	-	-	-	-	-	-	-
RDO	+	+	+	+	+	+	+
HNO3 5%	-	-	-	-	-	-	-
HNO3 10%	-	-	-	-	-	-	-
HNO3 15%	-	-	-	-	-	-	-

Les échantillons sont inclus en paraffine puis décalcifiés. Différentes concentrations d'EDTA et d'acide nitrique et de RDO ont été testées avec des temps de trempage variables. Le bloc a ensuite été coupé au microtome, le + indique une coupe réalisable, le - : qu'il n'a pas été possible de faire coupe correcte

Tableau 4: Echantillons décalcifiés avant d'être inclus en paraffine

	15min	18min	20min	45min	60min	24h	48h	4j	7j
EDTA 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EDTA 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EDTA 15%	-	-	-	-	-	-	-	+	+
RDO			+	+	+				
HNO3 5%	-	-	-						
HNO3 10%	-	-	-						
HNO3 15%	-	-	-	+					

Les échantillons sont d'abord décalcifiés avant d'être inclus en paraffine. Différentes concentrations d'EDTA et d'acide nitrique et de RDO ont été testées avec des temps de trempage variables. Le bloc a ensuite été coupé au microtome, le + indique une coupe réalisable, le - : qu'il n'a pas été possible de faire coupe correcte

2. La qualité des différentes coupes obtenues nous incite à retenir la décalcification avant l'inclusion en bloc de paraffine pour passer à la seconde étape : l'immunoréactivité des coupes par un marquage anti-CD31. Le CD31 est une protéine vasculaire spécifique. Elle est localisée en surface des cellules endothéliales. Le marquage de cette protéine applique le protocole suivant: Anticorps anti -CD31 dilués au 1/50 incubés 1 nuit à 4°C puis une révélation à l'IgM-FITC dilué au 1/500 et une contre coloration au DAPI.

Tableau 5: Immunoréactivité du tissu osseux selon différents protocoles de décalcification

RDO	-
HNO3 15%	-
EDTA 10%	-
EDTA 15%	-

Les échantillons décalcifiés avant d'être inclus ne sont plus immunoréactifs quelque soit le protocole de décalcification.

Le résultat est négatif pour les 4 protocoles de décalcification utilisés.

3. A la suite de cette série d'essais erreurs, nous nous sommes inspirés de la méthode décrite par Lesclous et al. (Lesclous et coll. 2004) qui nous a incités à utiliser une

méthode de décalcification plus douce et plus longue. Le marquage anti-CD31 s'est alors révélé positif.

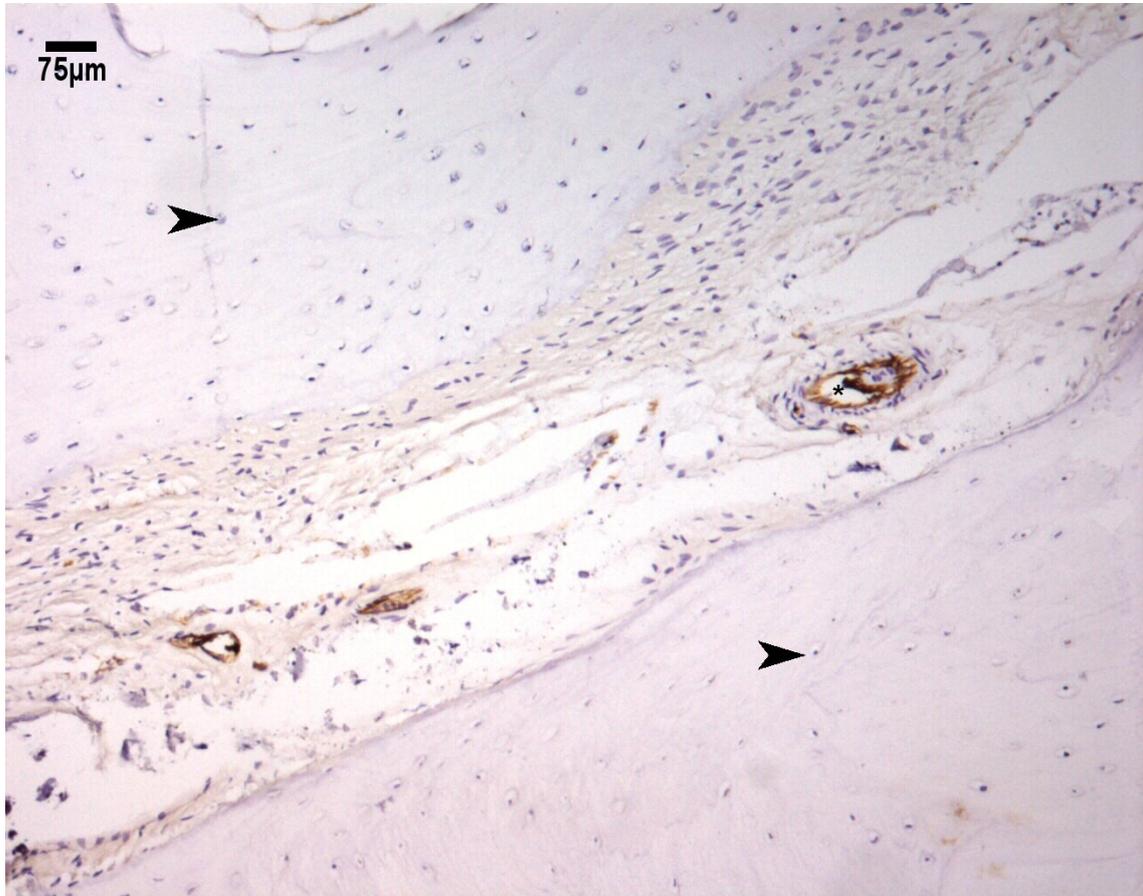


Figure 13: Marquage anti-CD31

*On note un marquage très spécifique des cellules endothéliales (\*) au sein du tissu osseux (flèche : ostéoblastes).*

4. La suite de la mise au point de notre technique d'immunomarquage est d'évaluer l'immunoréactivité du tissu osseux décalcifié au HSP47. HSP47 est une molécule chaperonne constitutive liée au collagène de type I. Le protocole appliqué pour le marquage HSP 47 est le suivant :

- Fixation paraformaldéhyde 4% pendant 24h
- Rinçage pendant 10 minutes au tampon phosphate, renouveler 5 fois
- Rinçage pendant une nuit
- Rinçage final le lendemain matin
- Décalcification EDTA 4,13% (E1644 Sigma), pH 7,2, sous agitation constante à 4°C
- Changement de bain d'EDTA toutes les 48heures

- Test de la décalcification à l'aide d'une aiguille s'il est possible de traverser le tissu, contrôle radiologique: la durée de décalcification est variable en fonction de la taille de la pièce anatomique de 30 à 45 jours
- Inclusion en paraffine dite « froide » : liquide à 56°C.
- Coupes au microtome 7-8 µm d'épaisseur.
- Marquage pour identifier les HSP47 (HSP47 antibody: Stressgen, mouse monoclonal antibody, rabbit reactive. Ref: SPA-470D) est fait en fluorescence.

Cependant, l'autofluorescence du tissu osseux rend ces coupes ininterprétables (Figure 14).

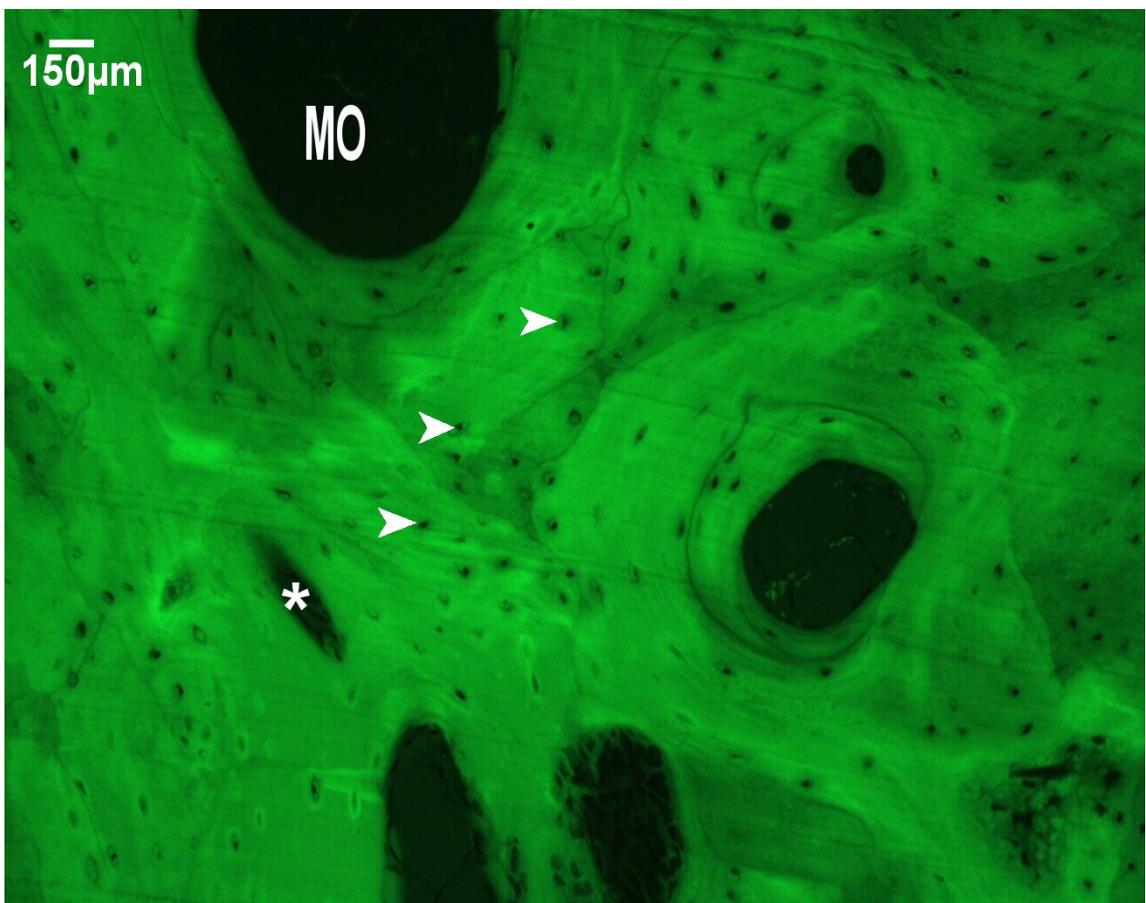


Figure 14: Autofluorescence du tissu osseux

*Coupe de tissu osseux observé en microscopie optique avec un filtre vert, aucun marquage ni coloration n'a été appliqué, l'autofluorescence du tissu est manifeste.*

Les analyses immunologiques visant à marquer la présence de HSP sont donc réalisées en technique peroxydase selon le protocole suivant. (Le protocole pas à pas est détaillé dans le chapitre 5.6.2)

- Les lames sont déparaffinées

- Puis une incubation des lames est effectuée pendant 15 min à la Saponine 2 % à TA. Lavage au PBS 1 X
- Traitement à la Protéinase K pendant 10 min à TA. Lavage au PBS pendant 5 min.
- Les sites non spécifiques sont bloqués à l'aide de sérum de cheval (kit ABC peroxydase de Vector) pendant 10 min.
- Incubation en présence de l'anticorps primaire anti HSP 47 dilué au 1/50 pendant 1 nuit à 37 °C en chambre humide.
- Lavage au PBS,
- Protocole de marquage secondaire à l'aide du kit ABC peroxydase de Vector
- Révélation de la coloration et observation.

Le marquage de HSP 47 est illustré ci-dessous :

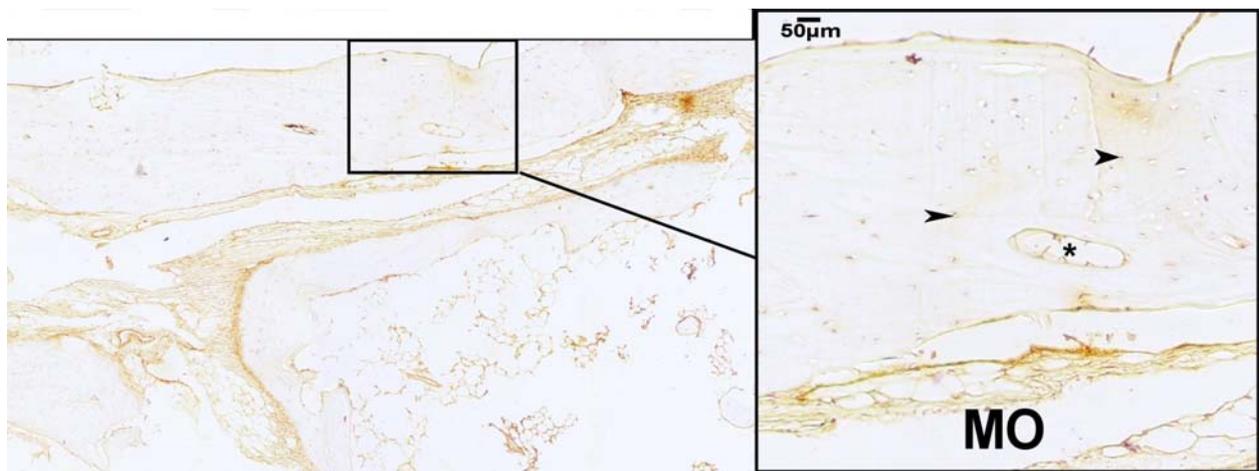


Figure 15 Immunomarquage HSP47 sur tissu osseux

*\*: artériole, MO : moelle osseuse, ostéocytes (flèche), marquage au niveau des parois des gros vaisseaux et diffus dans le tissu osseux : HSP47 molécule constitutive liée au collagène de type I, constituant principal de la phase organique du tissu osseux.*

Notre protocole étant au point pour l'immunomarquage des HSP47 constitutives, ce protocole est retenu pour l'étude de la production de HSP70 suite à l'application du Laser (Chapitre 5.6.2). Il consistera donc en une fixation à la paraformaldéhyde 4%, puis une décalcification douce à EDTA 4,13%, une inclusion en bloc de paraffine, coupe et immunomarquage en technique peroxydase.

## **5. MATERIELS ET METHODES**

A ce stade, notre travail bibliographique nous a permis de retenir différents paramètres utiles à la mise en place de notre protocole:

1. Longueur d'onde : Système diode laser 815 nm
2. Diamètre du spot : 4 mm
3. Durée du tir laser : 2 à 3 secondes
4. Zone d'implantation : calvaria centré entre les 2 orbites
5. Lésion secondaire : Irradiation par rayons X 18,75 Gy avec un tube à rayons X de faible énergie en une dose unique
6. Méthodologie d'immunomarquage des HSP 70 dans le tissu osseux

Nous avons ainsi défini le cadre et la ligne directrice pour nos expérimentations. La mise en place de notre partie expérimentale consiste tout d'abord à paramétrer la puissance du tir laser afin de contrôler la température induite au niveau osseux. Différentes mesures de températures sont réalisées afin de déterminer les paramètres de puissance optimale du tir laser pour induire une augmentation contrôlée de la température.

Ainsi le modèle est finalisé pour l'analyse de la réponse du tissu osseux à un préconditionnement laser avant lésion secondaire. Puis, l'étude est menée *in vivo* sur des lapins sur lesquels une chambre optique est implantée. La cicatrisation osseuse est évaluée par l'étude de la vascularisation: évolution de la densité vasculaire, du nombre de nœuds, de la longueur du réseau vasculaire et du nombre de vaisseaux en fonction de leur diamètre.

## **5.1. Le modèle animal**

### **5.1.1. La chambre optique**

Penel et al. ont mis au point un modèle d'observation de l'os *in vivo* au niveau de la calvaria basé sur l'implantation d'un dispositif transcutané : la chambre optique (Penel et al. 2005).

Une fenêtre optique en silice fondue est adaptée à une extrémité d'un cylindre en titane de 6 mm de hauteur (diamètre 5 mm, épaisseur 1 mm) (Figure 16 et Figure 18A). Cette partie est appliquée au contact osseux. A l'autre extrémité, le cylindre en titane maintient les tissus mous en place.



Figure 16: Chambre optique

### 5.1.2. La pose chirurgicale

20 lapins femelles de statut sanitaire contrôlé, de race New Zélande, âgées de 3–4 mois pesant entre 3 à 4 kg sont utilisées pour cette étude. Les lapins sont hébergés à l'animalerie du Département Hospitalo-universitaire de Recherche Expérimentale (agrément N°59-350120) de l'Université de Lille2 dans des conditions de laboratoire standard. Toutes les procédures sont conduites en conformité avec la directive 86/609/CEE. Les animaux sont gardés dans des cages individuelles, ayant à leur disposition nourriture et eau en quantité suffisante.

La pose chirurgicale de ce dispositif est réalisée sous anesthésie générale ; par injection sous cutanée de médétomidine (*Rompun*<sup>®</sup>) 0.1/100 ml à 500 µg/kg et d'une injection intramusculaire de kétamine (*Imalgène*<sup>®</sup>) 50 mg/ml à 25 mg/kg. La tête du lapin est rasée puis désinfectée à l'aide d'une solution iodée (*Bétadine*<sup>®</sup>). Une incision médiane de 3 cm, centrée entre les 2 orbites, est réalisée. Les plans cutané et musculaire sont réséqués mettant ainsi à nu le site d'implantation.

Une adaptation parfaite de la fenêtre est obtenue par fraisage osseux superficiel réalisé avec une fraise cylindrique en carbure de tungstène montée sur un micromoteur à basse vitesse de rotation (Bien Air, Anthogyr, Suisse). Après forage, la chambre optique est fixée sur le site osseux avec 3 minivis d'ostéosynthèse Modus vissées (longueur 3 mm, diamètre 0,9 mm, Medartis S.A.R.L, Vaulx Millieu, France) (Figure 17).

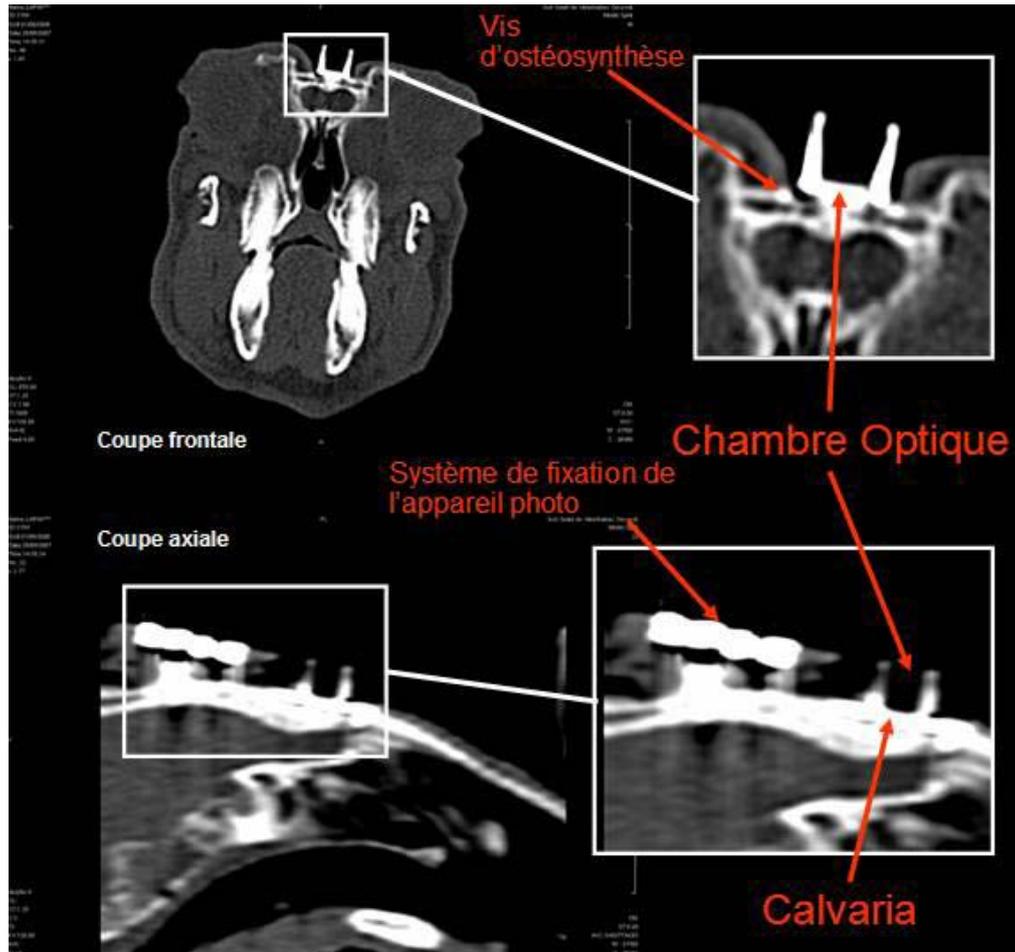


Figure 17: Scanner de la chambre optique implantée sur calvaria

*Les coupes scannographiques axiale et frontale montrent une implantation superficielle de la chambre au contact osseux, centrée entre les deux orbites en alignement avec le système de fixation de l'appareil photo : 3 screwpost supportant un plot de résine dans lequel 2 écrous sont inclus.*

La pose est faite de façon à centrer la chambre par rapport à la suture médiane.

Un second forage permet la fixation de trois screwpost en titane (Anthogyr, Suisse) (Figure 18 B). Ils servent de support à un socle de résine PMMA (*Tab2000*<sup>®</sup> · Kerr, Salerno, Italie) dans lequel sont noyés 2 écrous de stabilisation.

Ceci permet l'adaptation d'une plaque de fixation du système photographique qui assure la reproductibilité des clichés (Figure 20A). Une plastie des plans sous cutané et cutané permet l'adaptation des tissus mous autour du fût de la chambre optique. Ils sont ensuite suturés à l'aide de fils *Vicryl*<sup>®</sup> 3/0 résorbables.

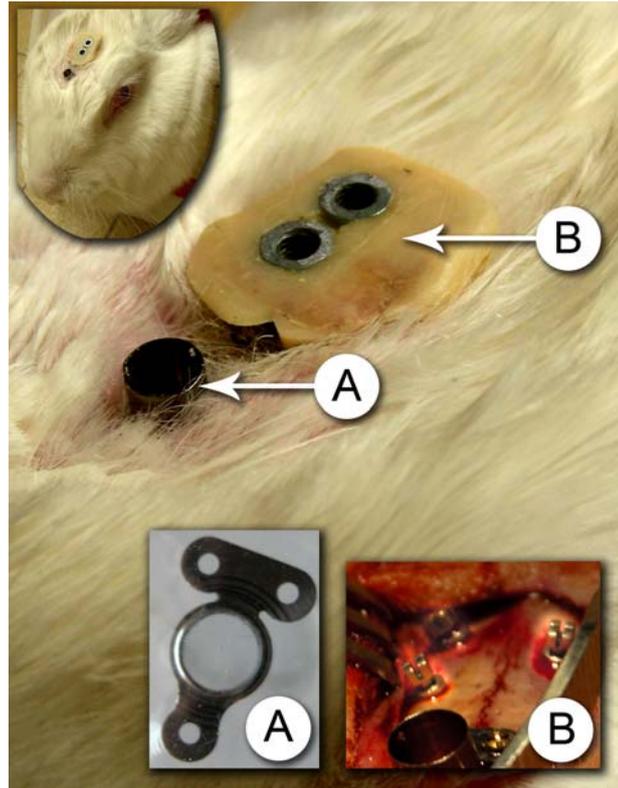


Figure 18: Chambre optique implantée (A) et dispositif de repositionnement (B)  
*L'ensemble du dispositif est bien intégré, aucune réaction inflammatoire ou de rejet n'a été observée. Les screw posts (B) supportent un plot de résine avec deux écrous permettant la fixation du dispositif pour les prises de vue.*

Un traitement antibiotique et analgésique est administré après l'intervention: Enrofloxaciné (*Baytril*<sup>®</sup>, Bayer, Puteaux, France) 50 mg/ml en injection sous cutanée à 0.2 ml/kg/j pendant 5 jours et Carprofène (*Rimaldyl*<sup>®</sup>, Vericore, Dundee, Ecosse) 50 mg/ml en injection sous cutanée à 0.06 ml/kg/j pendant 3 jours.

## **5.2. Caractérisation de l'interface**

### **5.2.1. Analyse Raman**

La nature de l'interface entre la chambre optique et le tissu sous-jacent est étudiée par spectroscopie Raman par G. Leroy et G. Falgayrac (laboratoire EA4032, Lille).

La spectroscopie Raman est basée sur l'interaction lumière - matière et résulte des vibrations moléculaires et cristallines. Le principe de la spectrométrie RAMAN est défini comme

suit : lorsque l'on soumet un échantillon à une onde électromagnétique monochromatique (typiquement un faisceau laser), l'échantillon va diffuser la lumière dans toutes les directions de l'espace. La lumière diffusée est collectée puis analysée par un spectromètre.

La lumière diffusée est composée de deux types de rayonnement (Figure 19)

- un rayonnement diffusé élastiquement : la diffusion Rayleigh.
- un rayonnement diffusé inélastiquement. Ce dernier se compose de deux contributions : la diffusion Raman Stokes et anti-Stokes. La longueur d'onde des photons diffusés est décalée par rapport à la longueur d'onde de la lumière excitatrice de  $(-v_v)$  pour la diffusion Raman Stokes et de  $(+v_v)$  pour la diffusion Raman anti-Stokes.

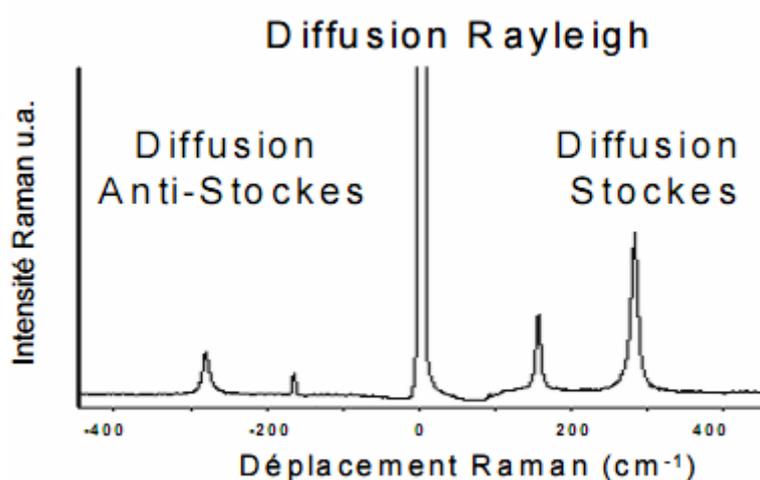


Figure 19: Exemple de spectre Raman, acquisition effectuée à une longueur d'onde excitatrice  $\lambda = 632\text{nm}$

La lumière diffusée (Stokes et Anti-Stokes) contient une information unique et caractéristique des vibrations des liaisons de la l'échantillon sondé. La spectroscopie Raman présente deux principaux avantages pour l'étude du tissu osseux:

- la caractérisation moléculaire simultanée des composés minéraux et organique,
- le caractère non-destructif de la méthode

Cette technique d'analyse est mise en œuvre au laboratoire EA4032 sur le microspectromètre Raman de type LabRAM (Horiba Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq, France). Il est doté des éléments suivants :

- Une source laser monochromatique excitatrice He-Ne  $\lambda=632,82\text{ nm}$
- Un microscope Olympus pourvu d'objectifs de grossissement  $\times 5$ ,  $\times 20$ ,  $\times 50$ ,  $\times 100$ .
- Un filtre Super Notch PlusTM qui élimine la lumière excitatrice.

- Un spectromètre
- Un détecteur CCD 1024×256 pixels refroidi à l'air
- Platine à micro déplacements XY.

Le signal Raman est focalisé à l'aide d'un objectif de microscope (×20) définissant un spot d'analyse d'environ 4  $\mu\text{m}$ . La résolution spectrale est de 2  $\text{cm}^{-1}$  pour une fenêtre d'acquisition de 200 à 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Pour chaque acquisition de spectre, le temps d'intégration est de 60 sec et un total de 10 accumulations est enregistré. Les spectres sont ensuite traités à l'aide du logiciel Labspec (Horiba Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) afin d'éliminer le maximum de bruit de fond. Cette configuration confocale autorise une exploration de l'échantillon selon l'axe Z (en profondeur) avec une résolution axiale de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ .

L'instrument dispose d'un mode imagerie Raman. Ce mode d'acquisition a pour but de représenter la distribution spatiale des composés identifiés par leur spectre Raman. Une zone de l'échantillon est choisie par microscopie optique pour être analysée. A l'aide de la platine à micro déplacements XY, la zone est balayée suivant les directions X et Y, point par point par micro spectrométrie Raman. Les déplacements de la platine sont équivalents à la taille du spot d'analyse (~ 1 $\mu\text{m}$ ). Le temps d'acquisition de l'image Raman est un compromis entre un bon rapport signal sur bruit et une durée totale non prohibitive.

Pour l'analyse en spectrométrie RAMAN, l'animal est anesthésié selon le même protocole que pour la chirurgie. Cette technique permet une analyse en profondeur avec la possibilité de faire varier le point d'analyse selon l'axe z, 3 zones ont été analysées : la vitre, l'interface et la masse osseuse. Différents points choisis à distance, à proximité ou sur les vaisseaux ont été analysés au niveau de l'interface.

### **5.2.2. Analyse histologique de l'interface chambre optique/os :**

Les échantillons osseux chambre en place sont prélevés en bloc. Des coupes transversales du tissu osseux et de la chambre implantée ont été réalisées pour étudier la nature de l'interface chambre optique / site osseux. Une biopsie d'une partie de la calvaria avec sa chambre optique est réalisée. L'échantillon est ensuite déshydraté dans différents bains d'éthanol (70%, 80%, 90%, 100%), puis dans de l'isopropanol pur. La pièce est alors incluse dans une solution de méthyl-metacrylate butyl-metacrylate (ratio 4:1) selon la méthodologie de Wolf (Wolf 1992).

Des coupes d'une épaisseur de 80 $\mu\text{m}$  sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome (Leica® 106 micro saw). Une coloration au Trichrome de Masson met en évidence les

structures calcifiées en les marquant en vert. Cette technique très particulière est réalisée au laboratoire de Biomatériaux et de Réparation tissulaire, U577, Faculté de Chirurgie Dentaire de Bordeaux.

Ces coupes ont été analysées en spectrométrie Raman, afin de caractériser la nature de l'interface. L'analyse a été menée sur une surface de 10 $\mu$ m de large sur 35 $\mu$ m de haut à l'interface os/ vitre de la chambre optique.

### **5.3. Etude de la vascularisation osseuse**

#### **5.3.1. Matériels**

Des images numériques sont prises avec un système adapté constitué de:

1. Un appareil photo numérique de type *Nikon Coolpix 5700*<sup>®</sup> réglé en mode paysage avec le zoom optique maximum (focale : 4.2)
2. Un objectif *Nikon*<sup>®</sup> 50 mm réglé sur l'inverse à l'infini (focale : 1.1) permettant un mode « macro » réglable manuellement avec une profondeur de champ de 1 mm.
3. 10 diodes électroluminescentes en anneau pour un éclairage optimal de la chambre.
4. Une plaque de fixation du système photographique vissée sur la tête du lapin par l'intermédiaire de 2 vis. Celles-ci sont fixées dans les écrous noyés dans le plot de résine lui-même fixé sur la tête du lapin. Une fois l'ensemble des écrous serrés le système photographique est donc totalement solidaire du crâne du lapin.

L'ensemble est positionné sur la tête du lapin par l'intermédiaire d'une boîte de contention et de la plaque de fixation assurant la reproductibilité du système (Figure 20). La sensibilité est réglée en mode automatique, le temps de prise est en moyenne de 1/69.9sec. Toute photographie ayant un temps de prise supérieur à 1/30sec est retirée de l'étude, car le bruit de fond est alors trop important.

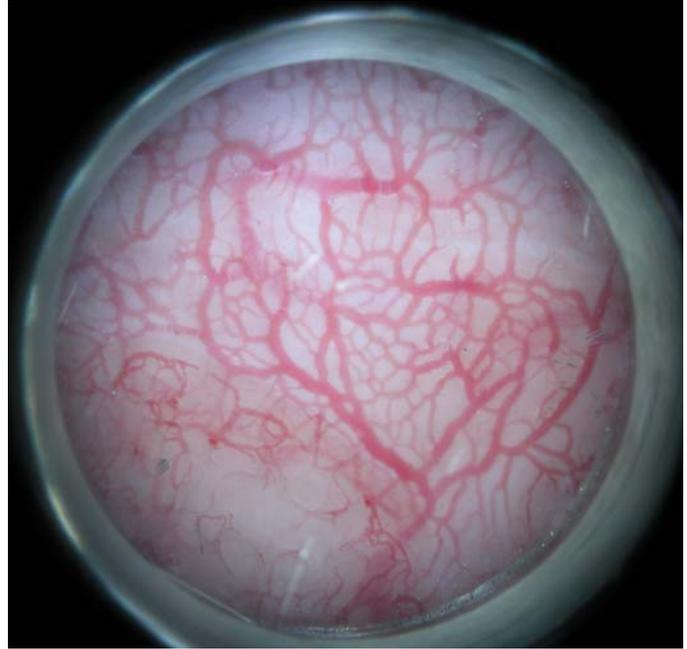


Figure 20: Réalisation des photographies

a) Système de prise des photographies

b) Exemple de photographie obtenue

Les photographies sont prises au même moment de la journée.

Chaque photographie est prise en triple exemplaire et enregistrée sous format TIFF.

### 5.3.2. Analyse de l'image

#### 5.3.2.1. Analyse des images par Imaq Vision Builder<sup>®</sup>

➤ Traitement de l'image

Chaque photographie est traitée par *Adobe Photoshop 8.0*<sup>®</sup> afin d'optimiser les informations. Un script, conçu par M. P. Rochon au Laboratoire U703, permet une standardisation des tâches suivantes (Figure 21):

- Passe-haut d'un rayon de 60 pixels. Conservation des contours là où des transitions nettes de couleurs surviennent et suppression du bruit de fond (détails de basse fréquence).
- Réglage des courbes : réglage de la tonalité de la gamme des tons d'une image à partir de 14 points de tons différents sur l'image de base.
- Correction sélective de l'image : noir 100% (accentuation des contrastes)

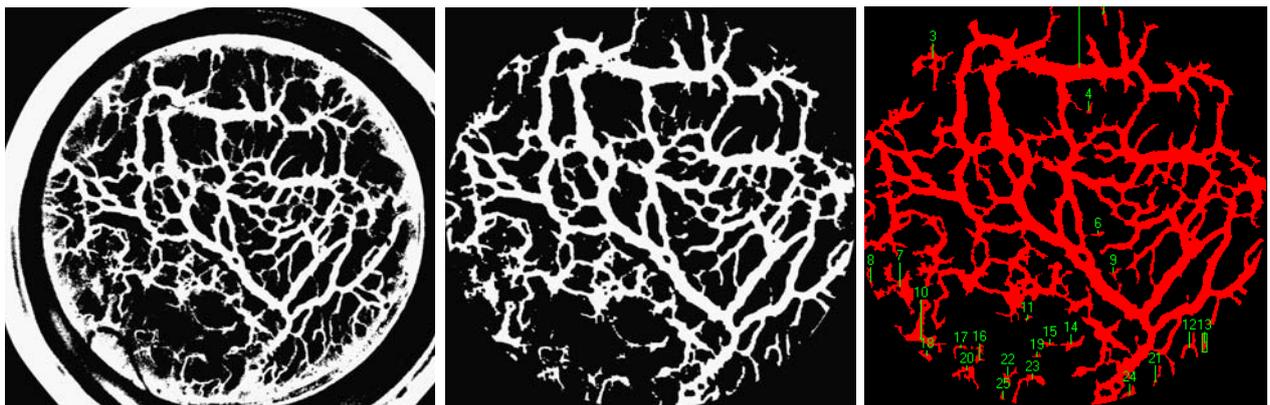


Figure 21: Image modifiée avec Adobe Photoshop 8.0<sup>®</sup>

➤ Exploitation des données (Figure 22)

La photographie est ensuite traitée par un second logiciel *Builder Imaq Vision*<sup>®</sup>. La taille de l'image originale est de 2560x1920pixels.

- Le réseau vasculaire est sélectionné
- L'image est binarisée (Figure 22A).
- La fermeture des objets et le filtrage des objets les plus petits optimise et lisse l'image.
- Le choix d'une région d'intérêt (ROI), cercle (rayon 700 pixels) centré sur la fenêtre, évite les biais liés aux bords de l'image (flou ou bords de la chambre optique) (Figure 22 B). La région d'intérêt est positionnée par l'opérateur sur chaque photographie.
- Tous les objets sont numérotés et le nombre de pixels de chaque particule est compté (Figure 22C).



A/ Image binaire

B / Sélection de la ROI

C/ Dénombrement des vaisseaux

Figure 22: Mesure de la densité vasculaire à l'aide de logiciel *Builder Imaq Vision*<sup>®</sup>.

### 5.3.2.2. Analyse des images par Aphelion™

La morphologie du réseau vasculaire varie pour chaque lapin. Notre première étude avec Builder Imaq Vision® nous permet une analyse de base de l'évolution du réseau vasculaire sans prendre en compte les variations en fonction de critères architecturaux. Ainsi, schématiquement, on distingue deux types de réseaux vasculaires :

- Un réseau constitué de capillaires très fins, où les vaisseaux ayant un diamètre compris de 5 à 15 µm sont majoritaires. Ce réseau fin est développé avec des vaisseaux enchevêtrés « en filet de pêche », qui est caractérisé par un nombre de nœuds et une longueur de réseau total importants.

- Un second type de réseau vasculaire est constitué essentiellement de vaisseaux de diamètres plus importants distribués autour d'un gros vaisseau central. Même si la densité vasculaire est identique au cas décrit précédemment, le nombre de nœuds et la longueur de réseau sont quant à eux beaucoup moins importants.

La répartition des animaux dans les différents groupes est aléatoire et chaque critère morphologique a sa propre réponse. C'est pourquoi, une étude approfondie de la réponse vasculaire est menée suite à l'analyse de la densité vasculaire. L'objectif est une étude quantitative fine des variations du réseau vasculaire en fonction de ses critères morphologiques.

Pour cela, un logiciel a été adapté pour l'analyse de nos photographies.

Aphelion™ (ADCIS-ADvanced Concepts in Imaging Software, Hérouville Saint-Clair, France) est un logiciel de traitement, d'analyse et d'interprétation d'images (Blacher 2005). Une macro semi-automatique capable de traiter des clichés couleur a été spécialement développée afin d'affiner l'analyse de nos images sur le plan morphologique.

L'ensemble des algorithmes développés permet :

- D'améliorer les images en appliquant des opérateurs de filtrage,
- De sélectionner les pixels compris entre une valeur minimale et maximale définies par un seuillage de niveaux d'intensité et ainsi d'obtenir une image binaire,
- D'isoler le réseau vasculaire et de détecter les bifurcations. Les vaisseaux sanguins sont détourés et découpés en objets. L'intersection de 2 objets représente un nœud.
- De calculer ainsi le nombre de nœuds, de branches du réseau vasculaire, leur longueur, la longueur totale du réseau et la longueur moyenne d'une branche du réseau
- D'isoler le squelette du réseau vasculaire et à partir de celui-ci d'évaluer le diamètre des branches.

Les interventions de l'opérateur se limitent à :

- Sélectionner le fichier image à traiter
- Définir une région d'intérêt (ROI), par le positionnement d'un cercle (rayon 700 pixels) centré sur la fenêtre, évitant ainsi les biais liés aux bords de l'image (flou ou bords de la chambre optique).
- Définir les seuils d'intensité pour extraire le réseau vasculaire. Grâce au seuillage, Aphelion™ peut repérer les différents objets présents sur la photographie et effectuer les calculs, ce qui est représenté sur les photographies ci-dessous (Figure 23).

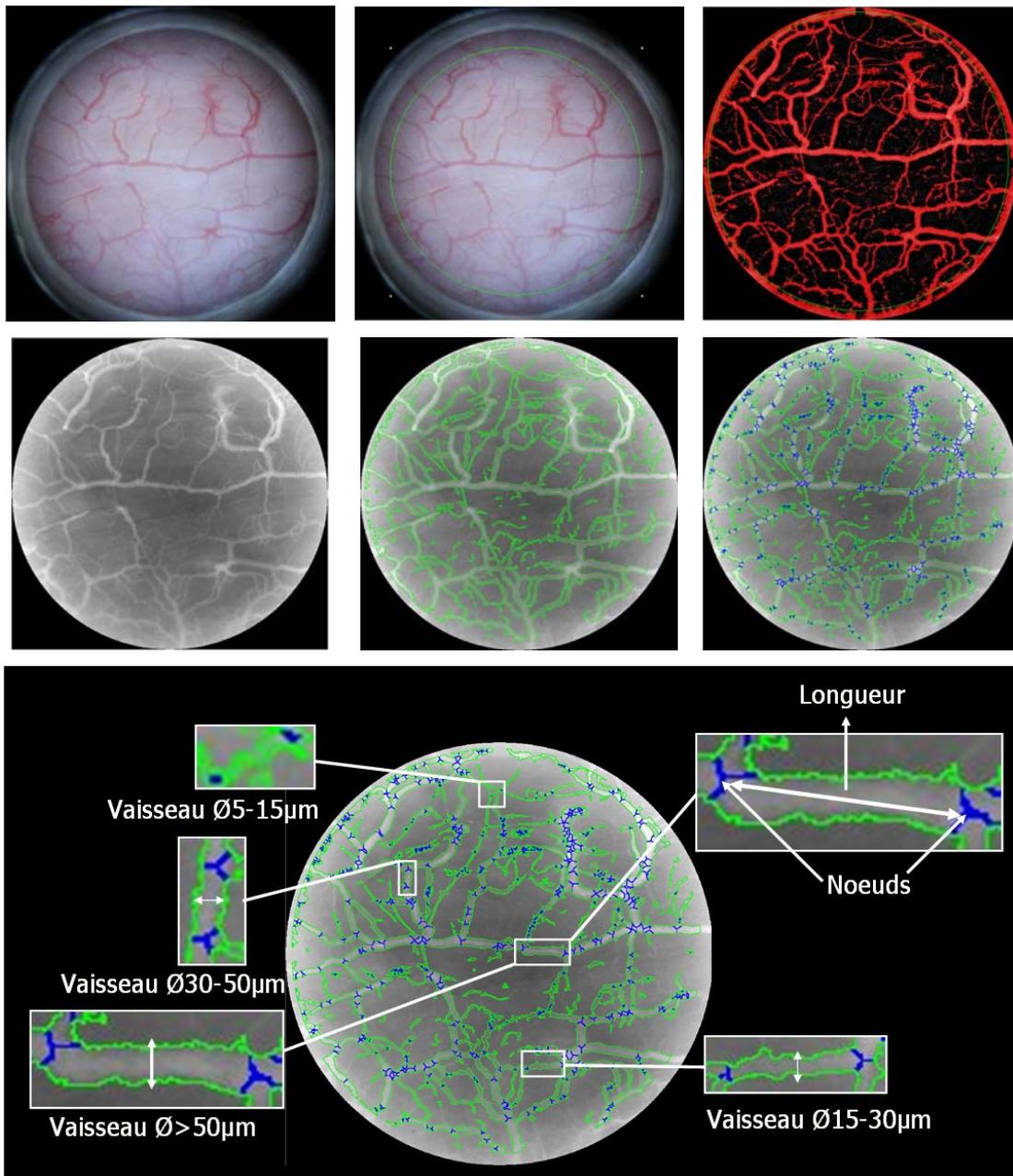


Figure 23: Analyse de l'image par Aphelion™

Ce logiciel nous permet ainsi de suivre l'évolution du :

- Nombre de nœuds (facteur caractéristique de l'angiogénèse)
- Longueur totale du réseau : somme de la longueur des branches (une branche étant comprise entre deux nœuds)
- Nombre de vaisseaux par classe de diamètre (Thompson et coll. 2002) :
  1. 5 – 15  $\mu\text{m}$  : diamètre moyen d'un capillaire
  2. 15 – 30  $\mu\text{m}$  et 30 – 50  $\mu\text{m}$  : vaisseaux de diamètre moyen
  3. > 50  $\mu\text{m}$  : artérioles.

### **5.3.3. Analyse statistique**

L'analyse statistique est réalisée avec l'aide de P. Devos et J. Salleron, Département de Biostatistiques, CERIM, Lille.

#### **5.3.3.1. Calcul de la densité vasculaire**

Les données sont enregistrées sur tableur Excel.

La somme du nombre de pixels représentant des îlots vasculaires est calculée. Elle est ensuite ramenée à la surface de l'image ; cette moyenne représente la densité vasculaire du jour (DV). Elle est donc définie par le pourcentage de pixels correspondant à des vaisseaux sanguins sur la totalité de l'image :  $DV (\%) = \text{Nombre de pixels « capillaire »} / \text{nombre de pixels total}$ .

Pour chaque lapin, une évaluation hebdomadaire de la DV a été enregistrée pendant 12 semaines. Les valeurs de DV sont exprimées en pourcentages normalisés par rapport à la valeur de base (semaine 0). Le dispositif de la chambre optique permet donc de réaliser une étude longitudinale de la densité vasculaire de chaque lapin et de comparer l'évolution de chaque groupe entre eux.

La moyenne et l'écart type moyen sont également calculés chaque semaine pour chaque groupe. Des comparaisons des moyennes normalisées sont effectuées en utilisant un modèle mixte linéaire bi-directionnel (effet de temps, effet de groupe et interaction). Une correction de Bonferroni est appliquée sur les résultats. Les effets de l'irradiation par rayons X et/ou du traitement laser sont calculés en utilisant des contrastes. Des analyses statistiques sont exécutées en utilisant le système SASV9.1 (SAS Institute Inc. Etats-Unis). Le niveau de signification est placé à 0.05 ( $p < 0.05$ ).

### 5.3.3.2. Caractéristiques morphologiques

Afin de pouvoir étudier l'impact de nos traitements sur la morphologie du réseau, les données sont normalisées et une valeur de 100 est attribuée à toute la cohorte comme point de départ de l'étude. Ainsi, les différences interindividuelles sont effacées et seule la tendance globale est étudiée. Comme pour la densité vasculaire, pour chaque image, les valeurs sont exprimées en pourcentages normalisés par rapport à la valeur de base (semaine 0). Cette analyse est réalisée pour trois points clés de notre étude : S0 ; S4 : point critique de la chute de la densité vasculaire après irradiation par rayons X et S8 : suivi à long terme.

Pour chaque groupe, l'analyse statistique est intra groupe (évolution du groupe : étude de l'effet du temps, effet traitement et interaction) et intergroupe (comparaison entre les groupes).

L'analyse par Aphelion™ donne les informations suivantes :

- Evolution du nombre de nœuds et de branches
- Evolution de la longueur totale du réseau par unité de surface
- Evolution du nombre de vaisseaux selon 4 classes : 5 à 15  $\mu\text{m}$ , 15 à 30  $\mu\text{m}$ , 30 à 50 $\mu\text{m}$  et supérieur à 50  $\mu\text{m}$ .

L'analyse statistique est faite à partir d'un modèle linéaire mixte (effet du temps, effet groupe et interaction) à l'aide du logiciel SAS System V9.1 (SAS Institute Inc. USA). A nouveau, une correction de Bonferroni est appliquée sur les résultats. Les effets de l'irradiation par rayons X et/ou du traitement laser sont calculés en utilisant des contrastes.

L'analyse intergroupe est possible uniquement lorsque les données évoluent de façon parallèle au cours du temps. Lorsque l'effet temps est significatif, le modèle utilisé ne permet pas une analyse intergroupe.

Le niveau de signification adopté est de 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## **5.4. Etude préliminaire : détermination de la puissance du tir laser**

### **5.4.1. Caractéristiques techniques du laser**

Un système diode laser est choisi pour son faisceau peu pénétrant et fortement absorbé par l'os et également pour sa maniabilité et sa fiabilité.

Le système diode laser est un composant optoélectronique à base de matériaux semi-conducteurs. La configuration de base est la même que celle des LED (light-emitting diode). Bien entendu, la puissance de la radiation est beaucoup plus importante dans le cadre des systèmes diode laser. La substance émissive GaAs (Arséniure de gallium) à structure cristalline émet de la lumière quand elle est traversée par un courant électrique (représentant le système de pompage). La cavité de résonance est constituée de 2 couches de cristal d'arséniure de gallium enrichi en aluminium (Ga Al As) (cf. Figure 7) (Roux 1999).

Ce système est une unité intégrée de diode laser (Figure 24) fabriquée par Opto Power Corporation (Tucson, AZ 85706, USA) de référence OPC-BO15-FCPS.

La longueur d'onde est de 815 nm, la puissance réglable par  $1/10^{\text{ème}}$  de W jusqu'à un maximum de 15 W. La durée du tir est réglable par milliseconde jusque 1 seconde puis par  $1/10^{\text{ème}}$  de seconde au-delà. Une fibre optique (CeramOptec GmbH, groupe biolitec, Bonn, Allemagne) de diamètre 600  $\mu\text{m}$  avec une ouverture numérique de 0,37 est reliée au système laser.



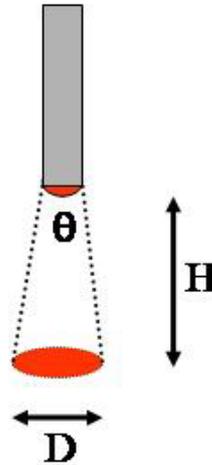
Figure 24: Système diode-laser 815 nm

Un spot de 4 mm est nécessaire pour traiter la surface totale de la fenêtre de la chambre optique implantée sur la calvaria.

L'ouverture numérique (ON) est de 0,37.

$$\text{ON} = \text{Sin}\theta$$

$$\text{Sin}\theta = \frac{D}{H}$$



Avec  $\theta$ : angle du faisceau en sortie de fibre.

D: diamètre du spot d'irradiation

H: distance entre la cible et la sortie de fibre.

Ainsi, le faisceau en sortie de fibre forme un angle  $\theta$  de 43 degrés.

Il faut donc une distance H de 6,2 mm pour obtenir un spot de diamètre D = 4 mm.

Pour la reproductibilité de l'expérimentation et pour sa stabilité durant la phase opératoire, une pièce à main est usinée au laboratoire U703 par M B. Buys (Figure 25). Elle permet de maintenir la fibre sur la chambre optique à une distance de tir correcte et stable ; 6,2 mm pour un spot de 4 mm.



Figure 25: Pièce à main mise au point pour la stimulation laser

Le système laser doit être paramétré afin d'engendrer une réaction du tissu osseux sans créer de dommage thermique. Le laser fournit une énergie caractérisée par les paramètres suivants : la puissance (P) du rayonnement laser (exprimé en Watts), la surface du spot (S en cm<sup>2</sup>) et le temps d'application du faisceau sur cette surface (T en seconde).

L'effet dépend de l'irradiance (I) et de la fluence (F) :

$$I = \frac{P}{S}$$

$$F = \frac{(P \times T)}{S}$$

La distribution de la chaleur dans le volume osseux du calvaria d'un lapin est étudiée afin de déterminer les paramètres optimaux de puissance du faisceau.

#### **5.4.2. Matériels de mesure de température**

Les mesures de température de la masse osseuse sont réalisées sur un prélèvement de calvaria de lapin avec le matériel suivant :

- Un thermocouple HYP1 type T, diamètre 0.3mm (Omega engineering, Stamford, USA). Le thermocouple ultra fast de type T est une microsonde (30 x13mm) implantable avec une capacité de réponse ultra rapide (6 Hz). Le delta des températures mesurables s'étale de -80°C à 200°C.
- Un système d'acquisition de température: USB-9211A. Ce module possède 4 voies d'entrées analogiques 24 bits pour enregistrer les mesures du thermocouple (National Instrument, Nanterre, France).

Les mesures sont réalisées sonde en place pendant le tir, chaque mesure est répétée 5 fois. La puissance du tir laser est contrôlée grâce à un wattmètre (Laserstar, L30A-SH, Ophir, Israel). La courbe de température obtenue est visualisée et enregistrée toutes les 167 msec grâce au Logiciel Labview 8.5 (National Instrument, Nanterre, France).

Ce système est mis en place avec l'aide de P. Rochon, laboratoire U703.

### 5.4.3.Méthode

Sur un prélèvement de calvaria de lapin, l'os est foré sur une longueur de 7 mm perpendiculairement à la surface de la corticale et donc perpendiculairement à l'axe du faisceau laser (Figure 26). L'épaisseur de la voûte crânienne étant particulièrement faible (2 à 3 mm), deux puits sont réalisés dans l'épaisseur osseuse à différentes profondeurs :

- Puit A : 0,7 mm de la surface,
- Puit B : 1,500 mm de la surface

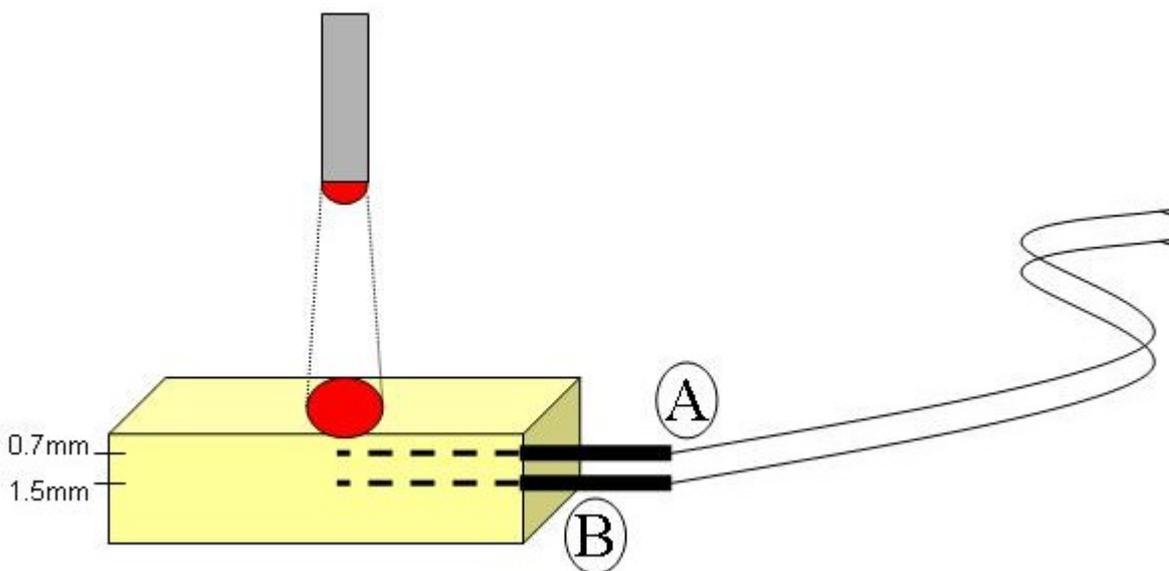


Figure 26: Protocole de mesure de température sur os sec

*A : Thermocouple placé dans le puit A à 0.7 mm de profondeur : émergence centrée sous le spot laser*

*B : Thermocouple placé dans le puit B à 1.5 mm de profondeur*

La pièce anatomique est plongée dans un thermobain réglé à une température de base de 41°C afin d'obtenir une température osseuse de 39°C (température physiologique du lapin).

Le système laser est ensuite fixé sur une platine permettant de contrôler le déplacement du laser dans l'espace. Ce dernier est placé afin d'obtenir un faisceau perpendiculaire à la surface osseuse de 4 mm de diamètre de spot (Figure 27).

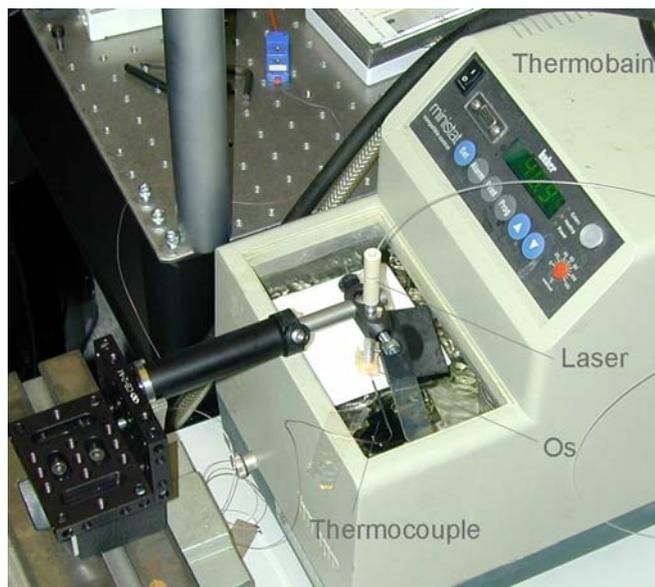


Figure 27: Montage pour les mesures de température induites par le tir laser sur os sec. *Os plongé dans un thermobain à 41°C, laser monté sur une platine permettant de modifier la position du spot dans les 3 sens de l'espace : réglage de la taille du spot et positionnement centré sur les thermocouples*

Dans un premier temps, la correspondance entre le centre du spot et l'émergence du thermocouple est recherchée en déplaçant la fibre laser selon les axes X et Y. La distribution de chaleur suit une courbe gaussienne du centre du spot aux bords de celui-ci. Un tir laser de 3 sec est effectué après l'ajustement du thermocouple et du spot laser. Différentes puissances sont testées et l'évolution de la température dans le temps est mesurée aux différentes profondeurs.

Les résultats obtenus sont ensuite comparés à une courbe de distribution théorique de la chaleur. Ce travail a été réalisé en collaboration avec B.WASSMER, Osyris, France. Un modèle mathématique optothermique précédemment décrit par Mordon et al permet une simulation numérique de la dynamique de transfert de la chaleur dans le tissu osseux (Mordon et coll. 2006). La transmission tissulaire de la chaleur est modélisée à partir de l'équation proposée par Zhang et coll (Zhang et coll. 2005).

Les constantes appliquées pour le calcul sont les suivantes :

$\rho$ : densité tissulaire :  $1000\text{kg/m}^3$

C: Chaleur spécifique tissulaire :  $2.37\text{ J/g }^\circ\text{C}$

K = conductivité thermique des tissus :  $0.34\text{ W/ mm}^{-1}\text{ }^\circ\text{C}$

r = Diamètre du spot : 4 mm

$\mu_a$ : Coefficient d'absorption :  $0.011\text{ mm}^{-1}$ ,

$\mu_s$ : Coefficient de diffusion :  $1.9\text{ mm}^{-1}$  (Bashkatov et al)

La modélisation mathématique apporte une meilleure compréhension de la distribution de la chaleur et permet de déterminer les paramètres optimaux du tir laser en tant que préconditionnement. Le modèle est basé sur un calcul décrivant la distribution de la lumière en utilisant une approximation de la théorie de la diffusion. Puis, l'augmentation de la température est modélisée en utilisant l'équation de la chaleur. Enfin, le dommage thermique induit par le laser est déterminé en utilisant la modélisation d'Arrhenius. Le modèle mathématique a été implémenté dans le logiciel Macsymba (Macsymba Inc., Arlington, MA, États-Unis).

Ces études préliminaires permettent de connaître le paramétrage du système laser sur os non vascularisé permettant de recréer les conditions décrites dans la littérature. Ces différents essais détermineront ainsi la puissance du tir laser

#### **5.4.4. Protocole d'irradiation par rayons X**

L'irradiation par rayons X est réalisée par T. Sarrazin, Département de Radiothérapie (sous la direction du Professeur E. Lartigau), Centre Oscar Lambret, Lille.

L'irradiation est réalisée avec le *Darpac 2000*<sup>®</sup> (Gulmay Medical, Surrey, Angleterre) muni d'un collimateur de 1 cm distribuant 249 cGy / min. Le faisceau est caractérisé par un filtre de 40 kV et de 8,6 mA.

Une dose totale de 18,75 Gy est délivrée en surface, soit 15 Gy à 2 mm de profondeur. A 8 mm de profondeur, le tissu reçoit la moitié de la dose soit 9,37 Gy, le rayonnement est donc superficiel. Ainsi, le tissu osseux est irradié en préservant au maximum le tissu cérébral.

Le traitement est réalisé sous sédation et anesthésie afin d'éviter tout mouvement du lapin. Le collimateur réduit le champ d'irradiation à un cercle d'1 cm de diamètre, centré sur la chambre. L'intégralité de la dose est délivrée en un temps.

### **5.5. Protocole de l'étude in vivo**

Une chambre optique est implantée sur 20 lapins. Après la pose de la chambre optique, une phase post-chirurgicale avec une instabilité du réseau vasculaire est observée pendant 8 à 10 semaines. Par conséquent, le début des observations (semaine 0 : S0) est avéré après une stabilisation du réseau pendant trois semaines consécutives.

Les 20 lapins sont répartis aléatoirement en quatre groupes de cinq animaux selon le protocole suivant (Figure 29):

- Groupe 1 : Groupe témoin (n=5).

Seule la chambre optique est posée sur ces animaux. Ils permettent d'observer la microvascularisation de la calvaria *in vivo* pendant la cicatrisation puis en situation para-physiologique.

➤ Groupe 2 : Application laser seule (n=5)

Après cicatrisation et stabilisation de la vascularisation, un traitement laser est appliqué au travers de la chambre optique (Figure 28). Le traitement est réalisé avec les paramètres déterminés précédemment : 1,5 W mesuré au wattmètre pendant 3 sec.

Le jour de l'application du laser est appelé J0, une photographie est prise juste avant le tir.

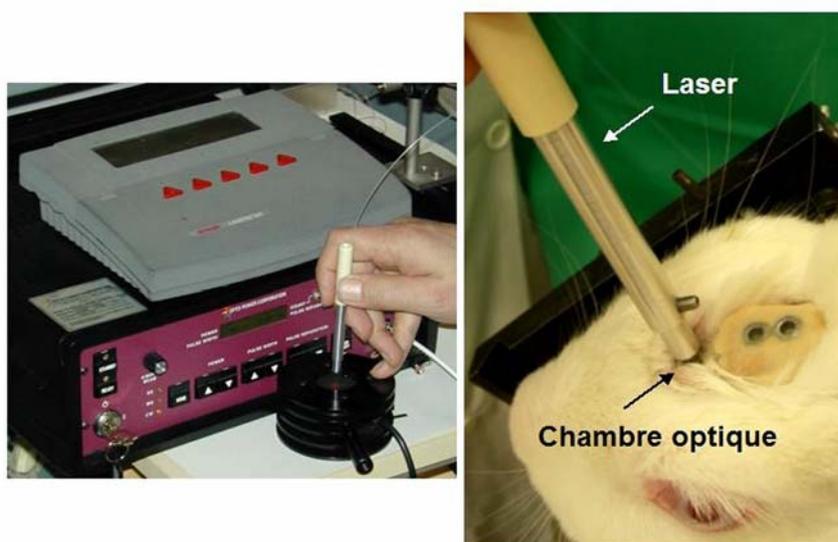


Figure 28: Application du préconditionnement laser

➤ Groupe 3 : Irradiation aux rayons X (n=5)

Une lésion osseuse est créée artificiellement par irradiation aux rayons X avec une dose de 18,75 Gy délivrée en un temps après cicatrisation et stabilisation de la vascularisation.

➤ Groupe 4 : Préconditionnement par traitement laser avant irradiation aux rayons X : (n=5)

Le preconditionnement par traitement laser est réalisé après stabilisation vasculaire à J0.

24 heures après (J1), une lésion est créée artificiellement sur l'os par irradiation aux rayons X (dose 18,75 Gy).

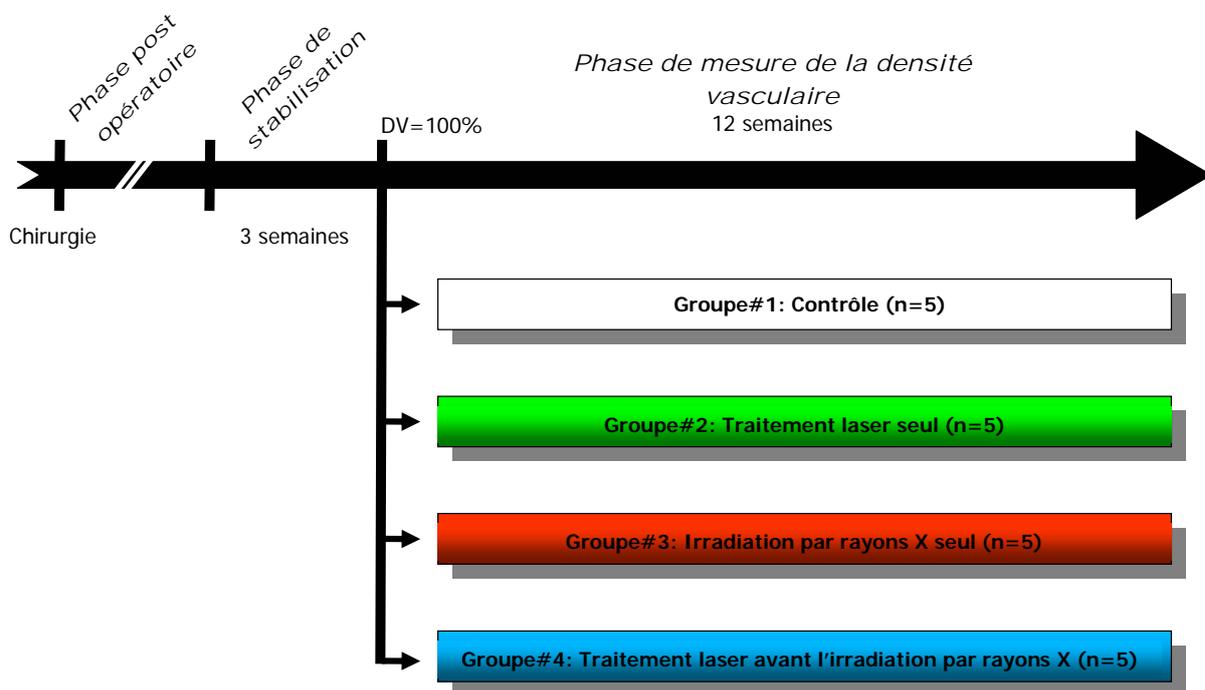


Figure 29: Protocole de l'étude *in vivo*

Les photographies sont prises trois fois par semaine durant les 3 premières semaines, puis hebdomadairement pendant 12 semaines. L'ensemble de ces photographies est enregistré, traité par logiciel et archivé.

## **5.6. Histologie**

### **5.6.1. Analyse histologique standard**

À la fin du suivi, les animaux sont anesthésiés suivant le protocole décrit précédemment et sacrifiés par injection intraveineuse de 0.3 ml/kg de Tanax T-61 (Tanax; Aventis, Strasbourg, France). La calvaria sous la chambre est biopsiée pour analyse histologique standard.

Ces analyses ont été réalisées par le Dr. C. Delattre, Département d'Anatomopathologie du CHRU de Lille.

Les échantillons sont fixés en paraformaline à 10% neutralisée et décalcifiés avec de l'acide nitrique à 10%. Après une déminéralisation complète, le tissu est inclus en paraffine. A

partir des blocs de paraffine, des coupes de 5 µm sont sectionnées parallèlement à l'axe de rayonnement des faisceaux. Une coloration à l'hématoxyline / éosine / safran est ensuite réalisée afin de caractériser d'éventuelles modifications histologiques. La microscopie en lumière polarisée a été employée pour analyser l'orientation des fibrilles de collagène de l'os et pour caractériser la structure osseuse.

### **5.6.2. Analyse immunohistologique**

Après fixation, décalcification et inclusion dans un bloc de paraffine selon le protocole décrit dans le chap.4.4, les coupes sont marquées anti HSP70 selon le protocole suivant:

L'anticorps HSP 70 utilisé est le suivant : HSP70 (HSP72) antibody: Stressgen, mouse monoclonal antibody, rabbit reactive. Ref: SPA-810D).

L'immunomarquage de lame positive et négative est réalisé en même temps pour la validation de la technique. Les témoins positifs utilisés sont des coupes d'artères de lapin.

Les lames sont déparaffinées selon la méthode suivante :

- 2 lavages de 50 min au Xylène
- 2 lavages de 5 min à l'EtOH 100%
- 2 lavages de 5 min à l'EtOH 95 %
- 2 lavages de 5 min à l'EtOH 75 %
- 2 lavages de 5 min au PBS 1 X

Puis une incubation des lames est effectuée pendant 15 min à la Saponine 2 % à TA. Les lames sont ensuite lavées 2 x 5 min au PBS 1 X.

Le protocole se poursuit par un traitement à la Protéinase K pendant 10 min à TA. Et les lames sont lavées 2 fois au PBS pendant 5 min.

Les sites non spécifiques sont bloqués à l'aide de sérum de cheval (kit ABC peroxydase de Vector) pendant 10 min. Les coupes sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire anti HSP 70 dilué au 1/50 pendant 1 nuit à 37 °C en chambre humide.

Après une nuit d'incubation, les lames sont lavées 2 fois au PBS, puis suivent le protocole suivant (kit ABC peroxydase de Vector) :

- incubation 1 heure en présence de l'anticorps secondaire anti mouse IgG biotinylé.
- 2 lavages au PBS 1X de 5 min
- Incubation dans un complexe peroxydase biotine avidine pendant 1 heure
- 2 lavages de 5 min au PBS 1X

Les lames sont révélées à l'aide d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Diaminobenzidine (DAB substrat coloré) pendant 3 min. Les lames sont lavées au PBS et contre colorées à l'hématoxyline de Gills dilué au 1/20.

Les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool (75 %, 95 %, 100 %), puis séchées, et mises entre lame et lamelle.

Le témoin négatif est réalisé en parallèle, l'anticorps primaire est remplacé par du sérum de cheval.

## **6. RESULTATS**

## 6.1. Validation du modèle animal

### 6.1.1. Tolérance à la chambre optique

L'implantation de la chambre optique est bien supportée par les animaux. Seul un lapin est mort à l'anesthésie, aucun autre accident per-opératoire et post-opératoire n'est à déplorer. Les premières photographies sont faites 2 à 3 jours après l'intervention. La formation d'un hématome sous la chambre est consécutive aux dommages infligés au tissu osseux lors de la chirurgie (Figure 30).



Figure 30: Exemple de cicatrisation du site osseux après la pose de la chambre optique  
*Involution de l'hématome post chirurgical visible entre J2 et J7, à J30 l'hématome a totalement disparu et un réseau vasculaire stable est établi.*

Lors de la première semaine, on observe une activation en cascade de la coagulation, premier pas vers la réparation osseuse : l'activité angiogénique de cet hématome aboutit à la formation progressive de nouveaux vaisseaux, comme nous l'avons exposé dans le chapitre 2.3. C'est pourquoi, le protocole débute sur un réseau vasculaire stable signant la fin du processus de cicatrisation, au trentième jour pour notre exemple. L'analyse statistique ne retrouve pas d'influence significative du temps sur la densité vasculaire du groupe contrôle (#1) pendant tout le suivi comme on peut l'observer ci-dessous (Figure 31) :

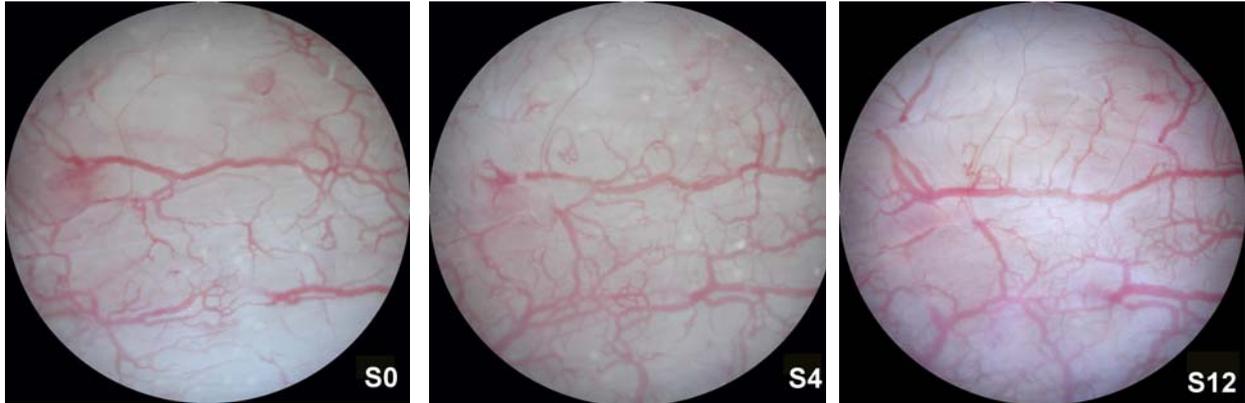


Figure 31 : Evolution du réseau vasculaire du groupe contrôle#1

*Une fois le réseau vasculaire établi et en l'absence de tout stimuli externe, une stabilité de ce dernier est observé durant les 12 semaines de l'étude.*

Cependant, l'analyse des différents critères architecturaux montre une chute significative des vaisseaux de gros diamètres. Après la phase post chirurgicale, la DV du groupe #1 reste stable montrant une bonne tolérance du système d'observation et la reproductibilité des enregistrements.

### 6.1.2. Analyse Raman

Des spectres Raman sont enregistrés afin de caractériser la nature de l'interface chambre optique / structures sous jacentes. La chambre a été balayée au point par point en spectrométrie Raman.

Le spectre caractéristique en cas d'un tir Laser ciblé sur un vaisseau visualisable sous la chambre est le suivant (Figure 32).

1. Le spectre Raman focalisé sur la vitre (Figure 32A, spectre supérieur), ne montre pas de bande entre 600-1200  $\Delta\text{cm}^{-1}$ . Seule la bande 667  $\text{cm}^{-1}$  caractérisant la silice (constituant principal du verre) sert de repère.

2. Un second point d'analyse est ensuite focalisé sur un vaisseau sanguin visible sous la chambre (Figure 32A, spectre central). L'analyse Raman met en évidence la présence simultanée à l'échelle du micron d'hémoglobine (754  $\text{cm}^{-1}$ ) et de la phase minérale osseuse (960 et 1070  $\text{cm}^{-1}$ ). Des bandes caractéristiques des constituants sanguins sont observées

(bandes 1169 & 1128  $\text{cm}^{-1}$  : pyrrole des érythrocytes,(Wood 2007), bandes 1002  $\text{cm}^{-1}$  & 977  $\text{cm}^{-1}$  : porphyrine (Ramser et coll. 2004)

3. Un troisième plan de focalisation du tir est réalisé au niveau du tissu sous jacent en dehors d'un capillaire identifiable macroscopiquement. Sur les zones éloignées des vaisseaux (Figure 32A, spectre inférieur), les bandes observées précédemment sont atténuées (1002 and 755  $\text{cm}^{-1}$ ) voir absentes (1169 and 1128  $\text{cm}^{-1}$ ) et les bandes caractéristiques du tissu osseux apparaissent. La bande principale est définie par la présence des phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$  de l'apatite à 959 et 1073  $\text{cm}^{-1}$  (Penel et coll. 1998; Lakshmi et coll. 2003; Penel et al. 2005 ). Donc, seule la signature spectrale de l'os est observée.

4. La seconde analyse (Figure 32B) présente deux spectres enregistrés sur des vaisseaux apparaissant sur différents plans. Le spectre obtenu à partir d'un vaisseau superficiel (Figure 32B, spectre inférieur) on retrouve les bandes caractéristiques de l'hémoglobine (756 $\text{cm}^{-1}$ ) et du phosphate de l'os (960  $\text{cm}^{-1}$ ). Pour le vaisseau plus profond (Figure 32B, spectre supérieur), la bande spectrale de l'os est plus marquée que celle de l'hémoglobine.

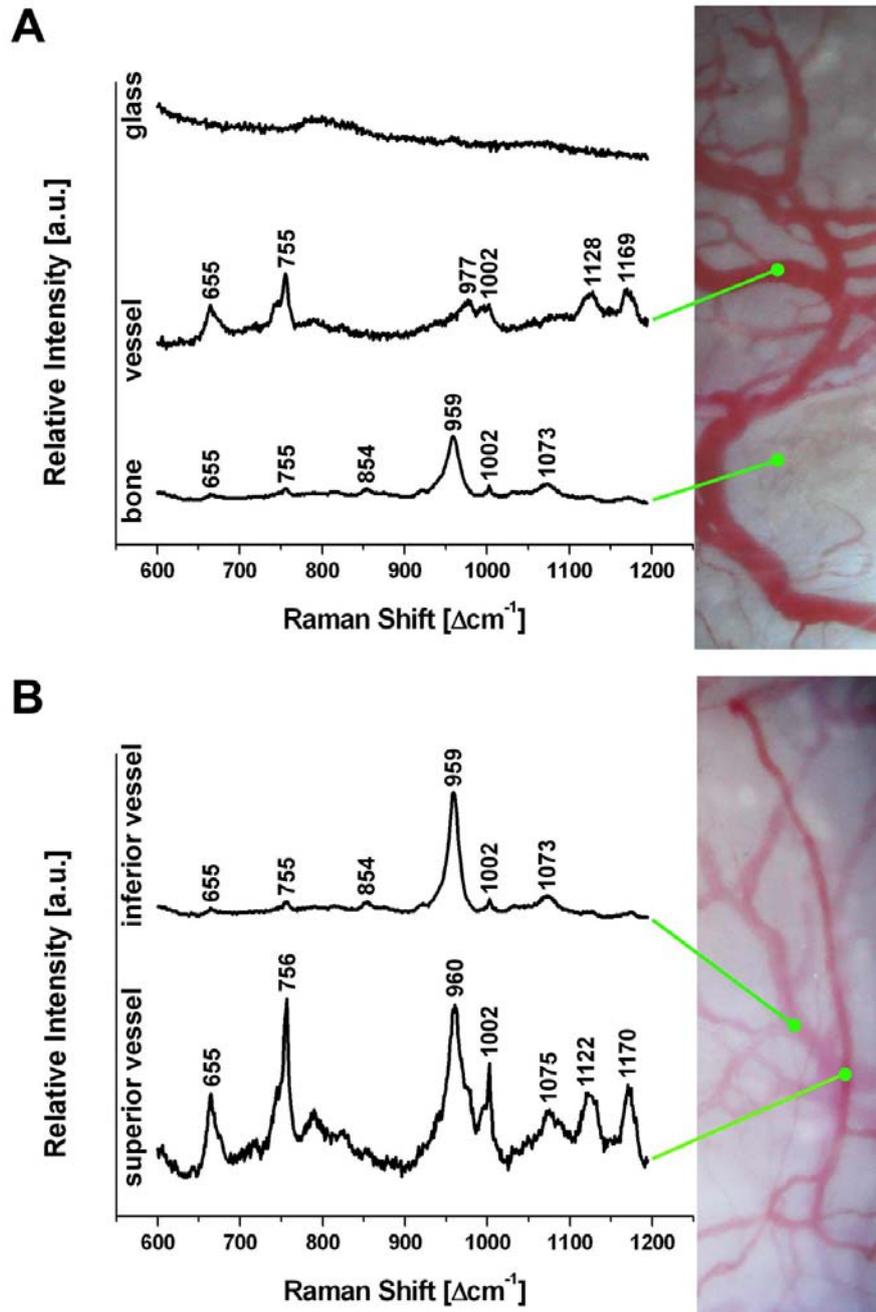


Figure 32 : Caractérisation Raman de l'interface chambre / Os

*Cette analyse de l'interface illustre la localisation osseuse du réseau vasculaire observé au travers de la chambre optique.*

*A/ Trois spectres sont obtenus en faisant varier le point d'analyse selon l'axe Z. Le premier spectre est obtenu suite à une focalisation sur la vitre. Le second spectre est le résultat d'une focalisation à l'interface. Le dernier est le plus profond tiré dans la masse osseuse.*

*B/ Deux spectres sont ensuite enregistrés sur des vaisseaux apparaissant sur différents plans. Le spectre obtenu à partir d'un vaisseau superficiel on retrouve les bandes caractéristiques de l'hémoglobine ( $756\text{cm}^{-1}$ ) et du phosphate de l'os ( $960\text{cm}^{-1}$ ). Pour le vaisseau plus profond, la bande spectrale de l'os est plus marquée que celle de l'hémoglobine*

### 6.1.3. Analyse histologique de l'interface chambre optique/os :

La coupe de la chambre optique implantée sur la calvaria du lapin permet la mise en évidence de la bonne intégration du système d'observation en site osseux.

Sachant que la coloration utilisée marque les structures calcifiées, il n'y a pas de tissu fibreux identifiable sous la chambre. Cette coupe montre un contact intime entre la fenêtre en silice de la chambre optique et le tissu osseux (Figure 33).

Les observations réalisées se font donc en site osseux.

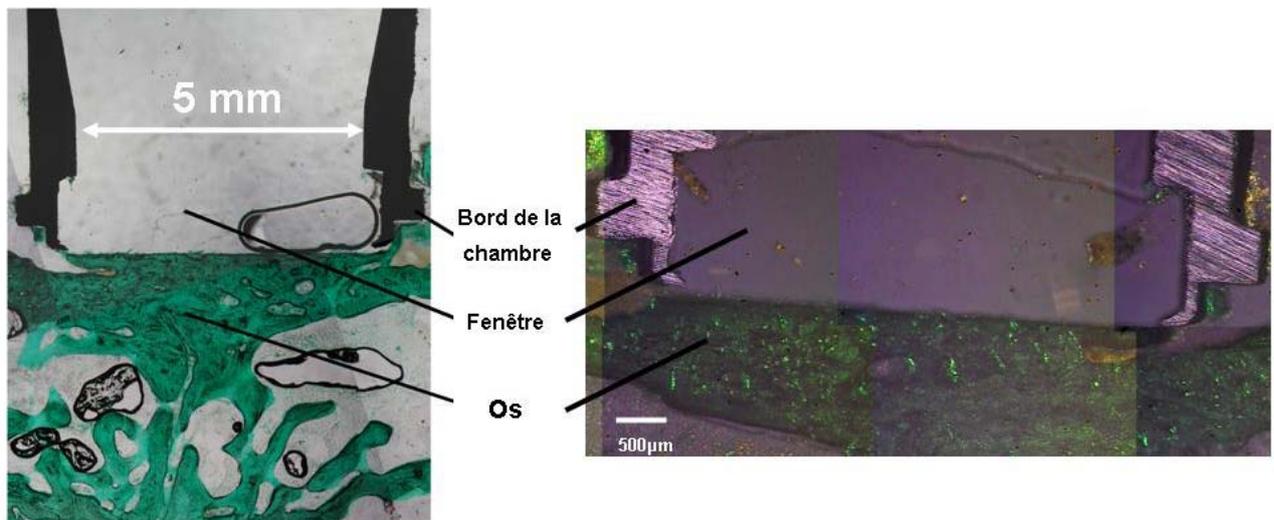


Figure 33 : Coupe histologique de la chambre et de son support osseux inclus en résine. La coloration de Wolf met en évidence les structures calcifiées (en vert) en contact étroit avec la vitre de la chambre optique.

Une analyse Raman de cette coupe histologique a été réalisée au niveau de l'interface sur une zone de 5 μm de large sur 35 μm de hauteur (cf. Figure 34).

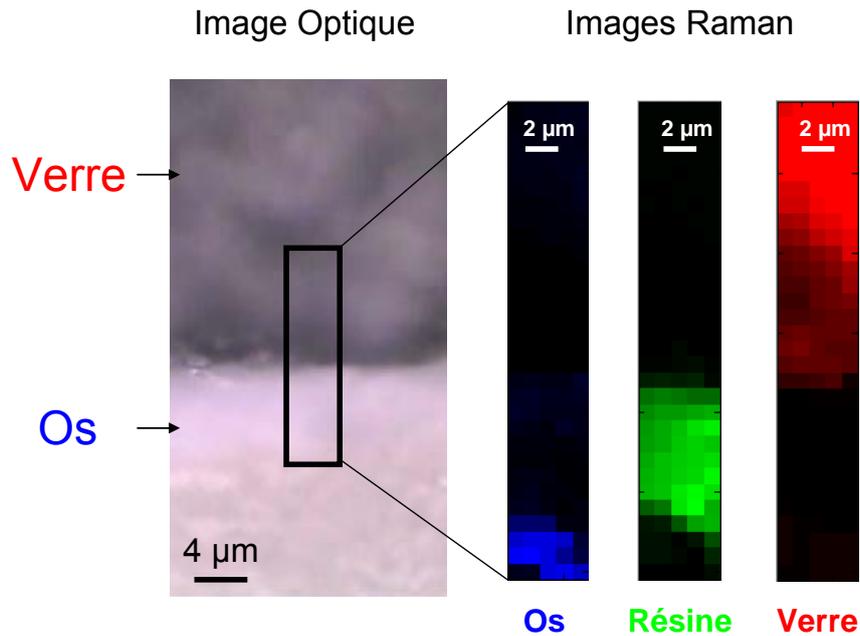


Figure 34: Interface Chambre Optique / Calvaria analysée par microscopie Raman en mode imagerie, taille zone analysée 5×35 µm.

A l'aide de la platine à micro déplacements XY, la zone est balayée suivant les directions X et Y, point par point par micro spectrométrie Raman. Les déplacements de la platine sont équivalents à la taille du spot d'analyse (~ 1µm). Chaque point d'analyse définit un spectre, si les bandes principales du spectre définissent le verre le point d'analyse apparaît rouge. Si les bandes prédominantes correspondent à des éléments de l'os (phosphate, carbonate...) le point d'analyse apparaît bleu. Pour la résine, le point d'analyse prend une couleur verte. L'intensité de chaque couleur reflète la pureté du spectre. Cette analyse permet donc de caractériser la présence de verre, d'os et une interface de résine de l'ordre de 10µm au niveau de la coupe histologique.

## **6.2. Paramétrage du tir laser : Résultats de l'étude sur os sec**

### **6.2.1. Mesures de température**

La courbe obtenue dans la masse osseuse montre une élévation rapide de la température pendant le tir, avec un retour à la température de base dans les 20 secondes

après la fin du tir (Fig.18). De par son faible diamètre, la sonde emmagasine très peu d'énergie et la restitue sous forme de chaleur pratiquement instantanément. La courbe d'élévation de température observée correspond donc bien à des modifications du milieu osseux. Au niveau de la jonction os / dure-mère, de faibles variations de température sont observées.

Les courbes ci dessous présentent les différentes puissances de tir testées et l'évolution de la température pendant les 3 secondes du tir et les 20 secondes suivantes. Chaque paramétrage est testé 5 fois, la moyenne des résultats est présentée ci-dessous :

- Pour le Puit A à 0,7mm de profondeur (Figure 35)

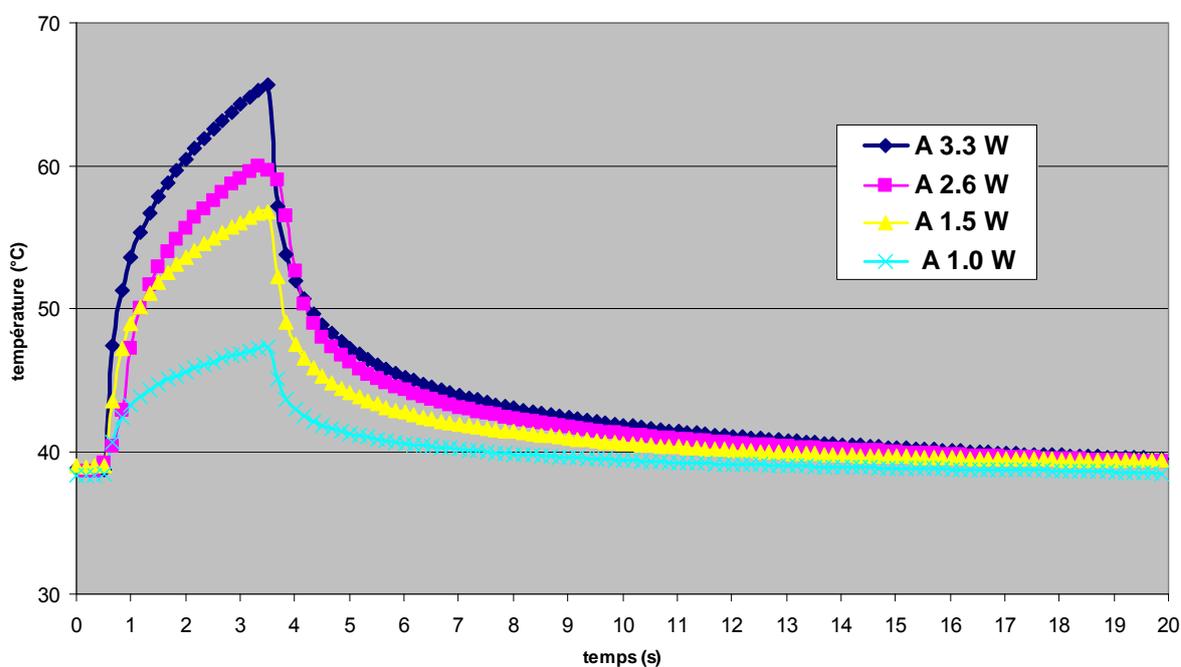


Figure 35: Evolution de la température osseuse à 0.7 mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : mesures expérimentales

- Pour le Puit B à 1.5mm de profondeur (Figure 36)

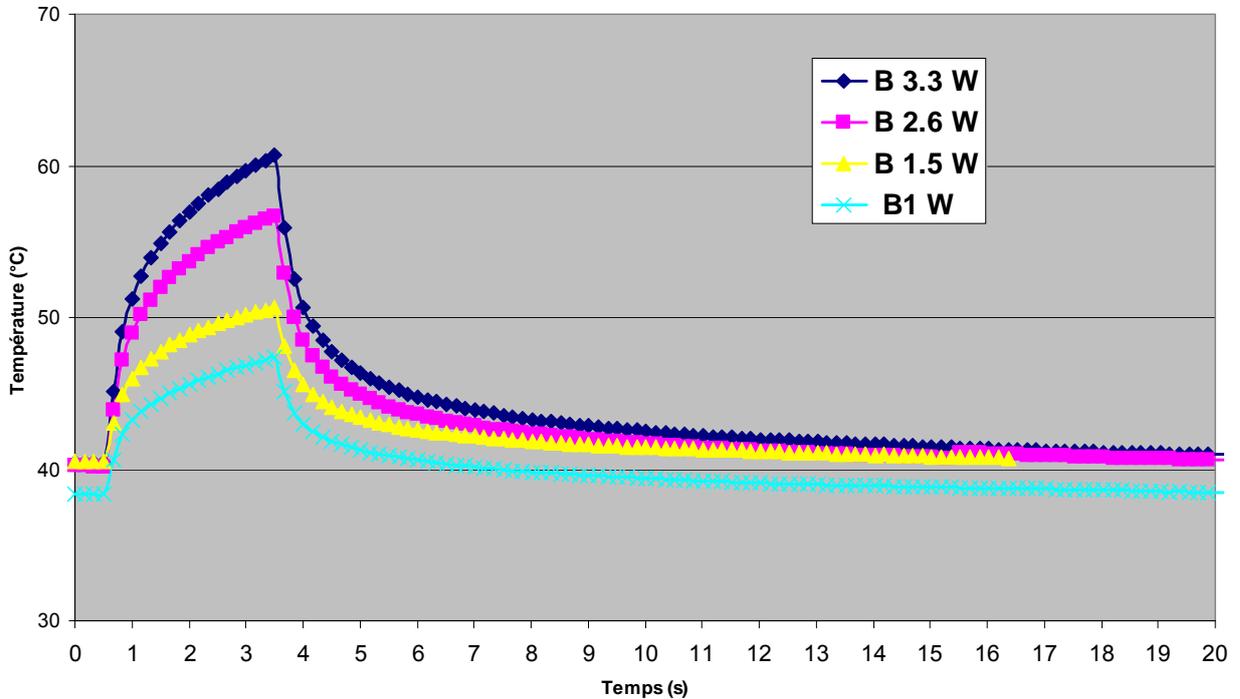


Figure 36 : Evolution de la température osseuse à 1.5mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : mesures expérimentales.

Les résultats sont constants à chaque répétition de mesures; le laser est un mode de chauffage très reproductible. Une augmentation d'environ 15°C en surface (Puit A) est obtenue pour un tir de 1.5 W pendant 3 sec et de 10°C à 1,5 mm de profondeur (Puit B). Ces données correspondent aux critères retrouvés dans la littérature (chapitre 3). La distribution de la chaleur est ensuite évaluée par modélisation informatique.

### 6.2.2. Modélisation

Les paramètres simulés par la modélisation mathématique sont basés sur les coefficients optiques du tissu osseux selon Bashkatov (Bashkatov 2006). Les calculs ont été réalisés selon le même protocole que pour l'expérimentation : 4 puissances de tir laser différentes (3,3W ; 2,6W ; 1,5W et 1W) à une profondeur de tissu (0,7mm (puit A) et 1,5mm (puit B)).

Les résultats de la modélisation en fonction de la puissance du tir laser sont exposés ci-dessous (Figure 37 et Figure 38). Le profil obtenu est comparable aux mesures expérimentales pour la montée en température. Un delta de température de 3 à 5°C est observé pour les

températures maximales à 3 secondes, fin du tir laser. Ainsi, une augmentation maximale de 12°C en surface (Puit A) est obtenue pour un tir de 1.5 W pendant 3 sec et de 9°C à 1,5 mm de profondeur (Puit B).

La chute de la température est plus rapide lors des mesures que pour la modélisation.

- Pour le Puit A à 0,7mm de profondeur

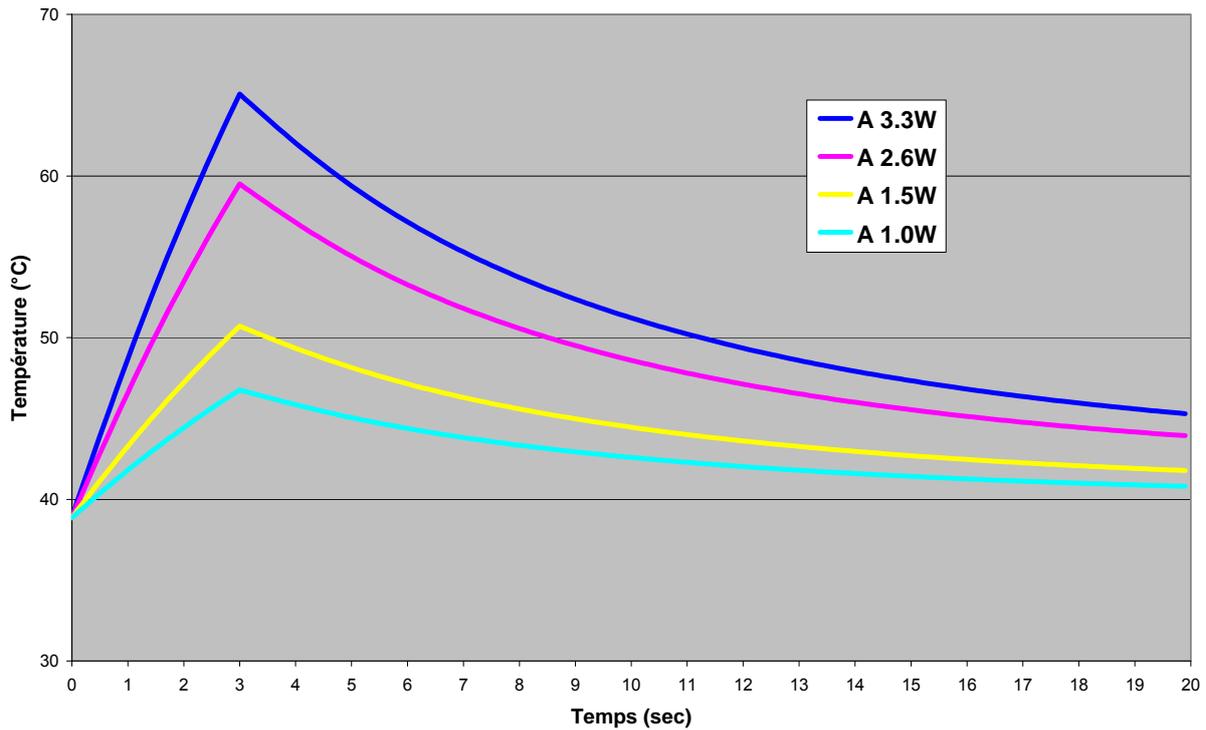


Figure 37: Evolution de la température osseuse à 0.7 mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : Modélisation mathématique

- Pour le Puit B à 1,5mm de profondeur

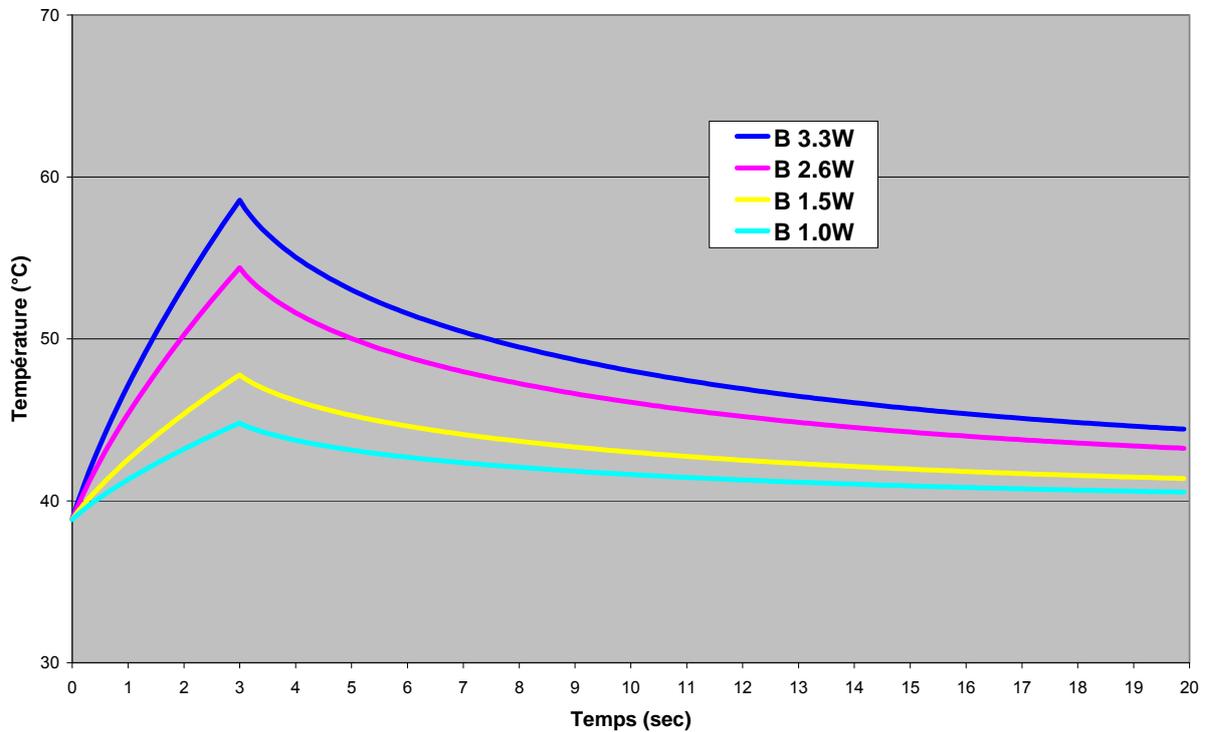


Figure 38: Evolution de la température osseuse à 1.5 mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : Modélisation mathématique.

La modélisation apporte une information supplémentaire qui est le profil de distribution de la chaleur dans l'espace. Les calculs sont réalisés sur un modèle de cylindre de 4mm de diamètre (taille du spot laser) de 2mm de hauteur (épaisseur moyenne de la calvaria osseuse). Le résultat est le suivant (Figure 39).

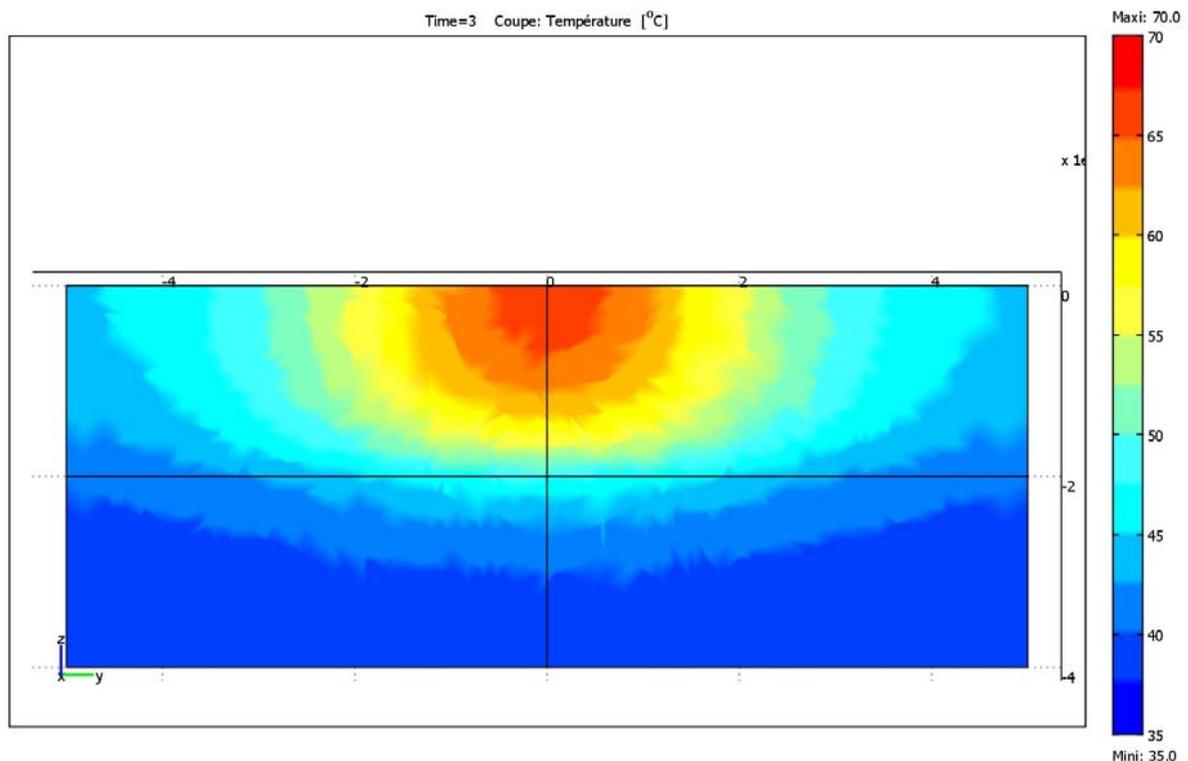


Figure 39: Modélisation mathématique de la distribution de la chaleur dans l'espace pour un tir de 3,3W.

*Le point le plus chaud (entre 65 et 70°C) ou cœur chaud est représenté en rouge. Sur ce modèle, la distribution thermique est limitée à une zone de 4mm de diamètre et de 2mm en profondeur, avec un cœur chaud au centre et un gradient de température de ce centre vers les bords.*

La distribution de la chaleur dans le tissu est de type gaussien avec un maximum de température au centre du spot.

### 6.2.3. Paramètres retenus

Suite aux mesures, une puissance de 1.53 W pour une durée de 3 sec est retenue pour les essais *in vivo*. Il existe une perte d'énergie le long de la fibre, la puissance en sortie de fibre est donc contrôlée à l'aide d'un wattmètre afin de connaître la puissance réelle appliquée sur le tissu osseux. Une puissance de 2 W affichée est mesurée en sortie de fibre à 1.53 W au wattmètre soit une fluence de 36 J/cm<sup>2</sup>. Comme nous l'avons déjà défini, la fluence (F) fait référence à la quantité d'énergie totale appliquée (Joules) par unité de surface (cm<sup>2</sup>).

Un point important est que le seuil de la douleur est beaucoup plus faible que le seuil détectable pour un préjudice physique (Dewhirst et coll. 2003): le lapin n'a pas de réaction au cours de notre tir laser ce qui laisse à penser que le tir laser n'est pas douloureux.

#### 6.2.4. Contrôle histologique

Une première validation de ce paramétrage est réalisée par une coupe histologique (Figure 40). Les paramètres définis ci-dessus sont appliqués sur un lapin. Douze heures après ce tir laser, l'animal est sacrifié et une partie de la calvaria est prélevé. Une analyse histologique standard du prélèvement osseux est réalisée (protocole chapitre 5.6.1) afin de contrôler la réaction tissulaire.



Figure 40 : Contrôle histologique du tissu osseux après tir laser.

*Intégrité cellulaire et tissulaire, présence de l'ensemble des noyaux des ostéocytes (flèches) et des cellules endothéliales (\*), éléments de la moelle (MO) intègres, pas de remaniement tissulaire : aucun signe de brûlure du tissu. Coloration HES*

### 6.3. Résultats de l'étude in vivo

#### 6.3.1. Etude *in vivo* : évolution de la densité vasculaire (DV)

L'analyse des images a permis de quantifier la densité vasculaire. Les résultats sont exposés sur la Figure 41.

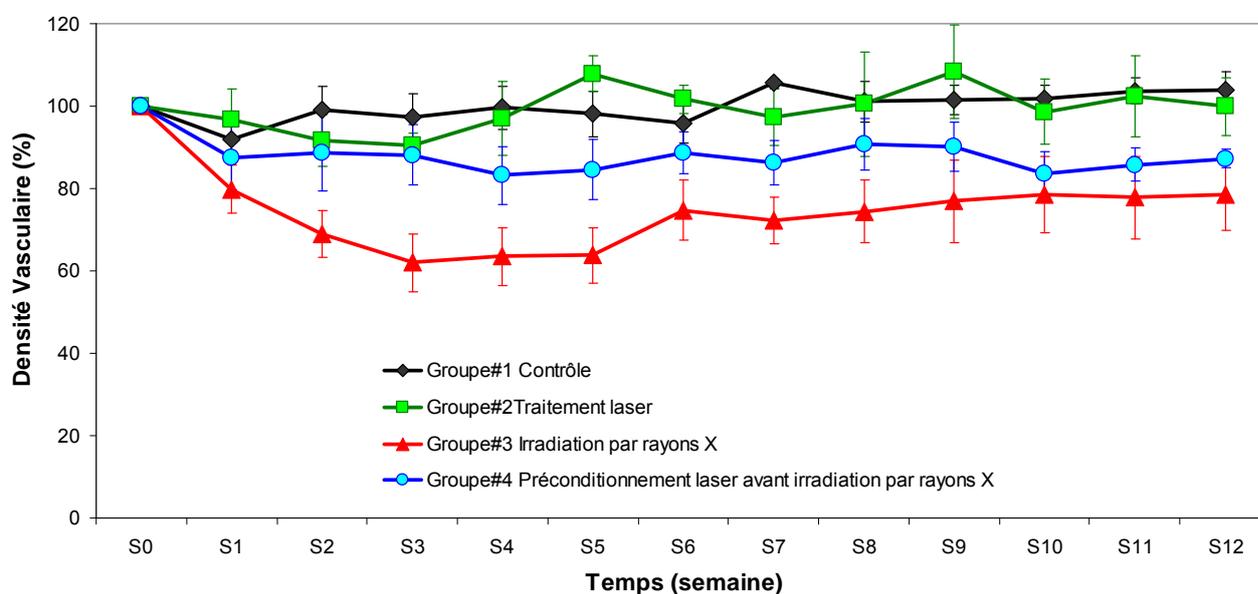


Figure 41: Evolution de la densité vasculaire selon les différents stimuli appliqués sur l'os

*Le groupe contrôle #1 et laser #2 sont stables durant les 12 semaines de suivi, l'irradiation par rayons X #3 induit une chute de la densité vasculaire durant les 4 premières semaines et se stabilise à un niveau bas durant la suite de l'étude. Le groupe Laser avant irradiation aux rayons X #4 montre une chute moins importante puis une stabilisation.*

Aucune différence significative entre l'évolution de la DV entre le groupe contrôle (#1) et le groupe laser (#2) n'est observée ( $p > 0.5$ ). L'analyse statistique ne retrouve pas d'influence significative du temps et du tir laser sur la densité vasculaire du groupe laser (#2). Comme pour le groupe contrôle (#1), le réseau vasculaire des lapins du groupe laser (#2) ne montre pas d'évolution statistiquement significative pendant tout le suivi comme on peut l'observer sur l'exemple ci-dessous (Figure 42):

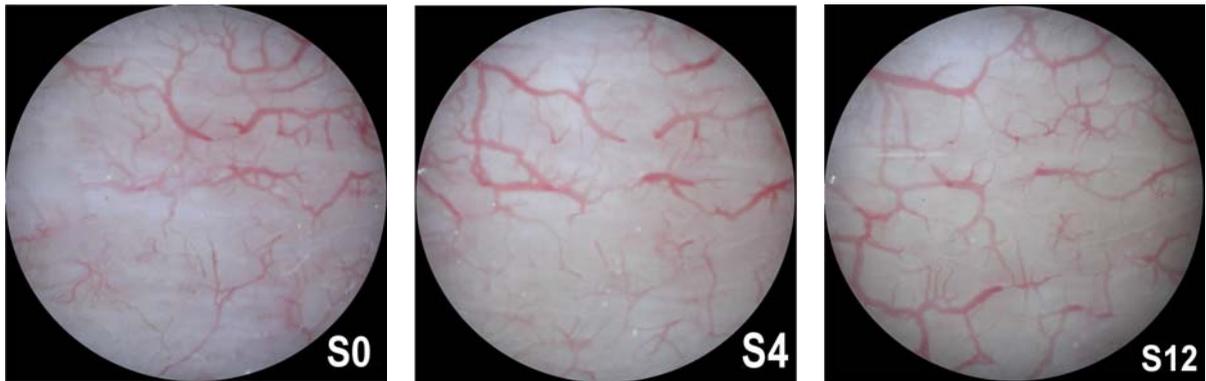


Figure 42: Evolution du réseau vasculaire d'un lapin du groupe laser (#2)

*Exemple d'un lapin du groupe #2 : Stabilité du réseau vasculaire pendant les 12 semaines de suivi de l'étude.*

L'irradiation par rayons X appliquée au travers de la chambre optique induit une chute du réseau vasculaire initial comme le montre la Figure 43.

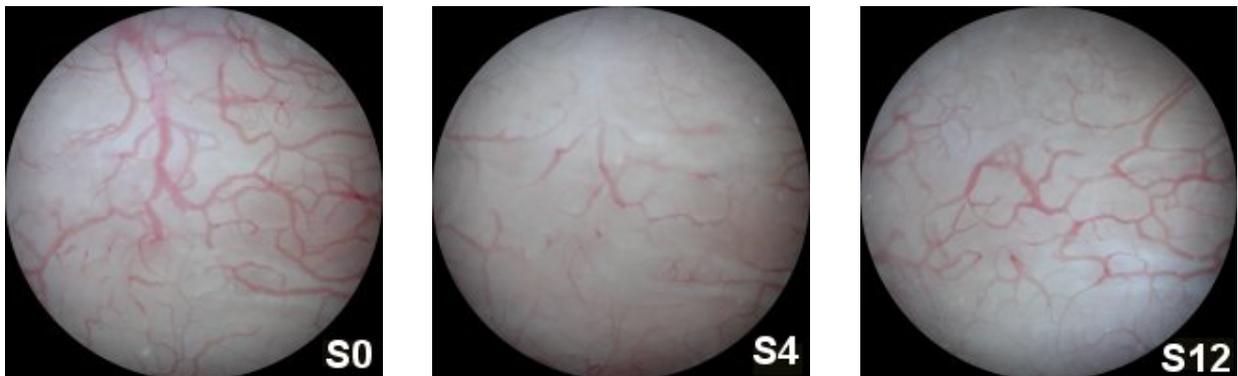


Figure 43: Evolution du réseau vasculaire d'un lapin du groupe rayons X (#3)

*Exemple d'un lapin du groupe #3 : à S4 on observe une disparition du réseau vasculaire qui se réorganise à la S12.*

L'irradiation par rayons X a eu un effet vasculaire sur les deux groupes irradiés (groupes #3 et #4). En effet, une chute significative de la DV est observée pendant le suivi de 12 semaines. Ainsi, le groupe irradiation par rayons X (#3) est significativement différent du groupe contrôle (#1) (groupe #1 vs. groupe #3  $p < 0.0001$ ).

Il en est de même pour le groupe traitement laser avant irradiation par rayons X (#4) (groupe #1 vs. groupe #4  $p < 0.05$ ). L'effet délétère des rayons X couramment décrit sur le réseau vasculaire osseux est donc confirmé. Cependant, l'évolution de la DV est

significativement différente entre le groupe #3 et le groupe #4 ( $p < 0.05$ ). Ainsi, la diminution de la DV est moins importante dans le groupe #4 (Figure 44).

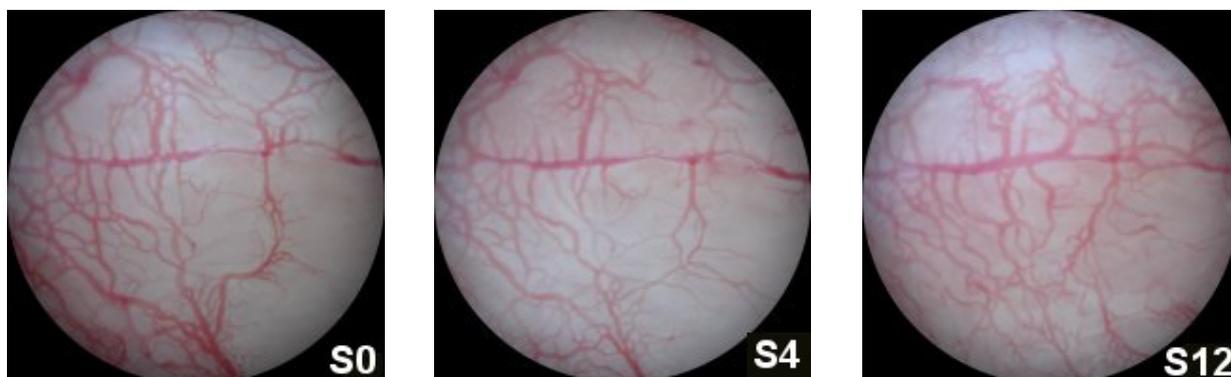


Figure 44: Evolution du réseau vasculaire d'un lapin du groupe laser avant rayons X (#4)  
*Exemple d'un lapin du groupe #4 : le réseau vasculaire se raréfie à S4 pour retrouver une architecture similaire à celle initiale à S12.*

Ainsi, pendant une première phase (S0 à S4), pour le groupe #3, l'irradiation par rayons X induit une chute de la DV à 65% de sa valeur initiale à S0 et seulement à 80% de sa valeur initiale pour le groupe #4. Lors d'une seconde phase (S5 à S12), la DV remonte lentement et progressivement pour les deux groupes. Cependant, l'augmentation est très limitée pour le groupe #3 (de 65% à 75% de sa valeur initiale à S12) et reste sous sa valeur initiale (DV à S0). Dans le groupe #4, la DV augmente de 80% à 90% de sa valeur initiale puis se stabilise.

### **6.3.2. Etude de la morphologie du réseau vasculaire.**

Face aux résultats de l'évolution de la densité vasculaire, il nous a semblé pertinent de pousser l'analyse du réseau vasculaire sur des critères morphologiques. Ainsi, l'évolution du nombre de nœuds, de la longueur totale du réseau vasculaire et du nombre de vaisseaux en fonction de leur diamètre est faite à des temps clés de l'étude : S0 : début de l'étude, S4 : point critique de la chute de la vascularisation après irradiation par rayons X et S8 : phase de stabilisation. Ces temps ont été choisis suite aux résultats de la première étude de l'évolution de la densité vasculaire.

Les résultats de l'évolution des critères morphologiques sont exposés sur les courbes ci-après (Figure 45).

L'analyse statistique montre que le réseau vasculaire est stable pour les 2 groupes contrôle et laser (#1 et #2) durant le suivi.

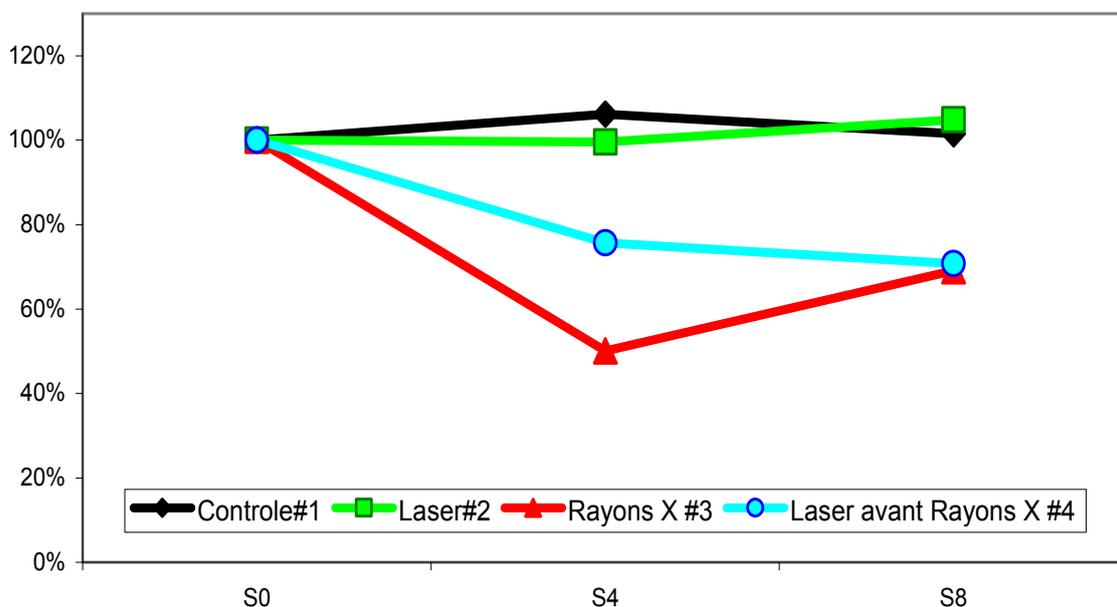


Figure 45: Evolution du nombre de nœuds

Concernant le nombre de nœuds (Figure 45), l'analyse intragroupe montre pour:

- le groupe contrôle #1 : pas d'évolution significative entre S0 / S4 / S8
- le groupe laser #2 : pas d'évolution significative entre S0 / S4 / S8
- le groupe rayons X #3 : une diminution significative du nombre de nœuds entre S0 / S8:  $p < 0.05$  avec une chute très significative entre S0 et S4 :  $p < 0.0001$
- le groupe laser avant rayons X #4 : une diminution significative du nombre de nœuds entre S0 / S8:  $p < 0.05$  mais avec une chute entre S0 et S4 :  $p < 0.05$

Le groupe préconditionnement laser (#4) montre une diminution significative mais limitée entre S0 / S4 contrairement au groupe irradiation aux rayons X (#3).

L'analyse statistique intergroupe n'est pas réalisée pour les données sur les nœuds car l'effet temps est significatif.

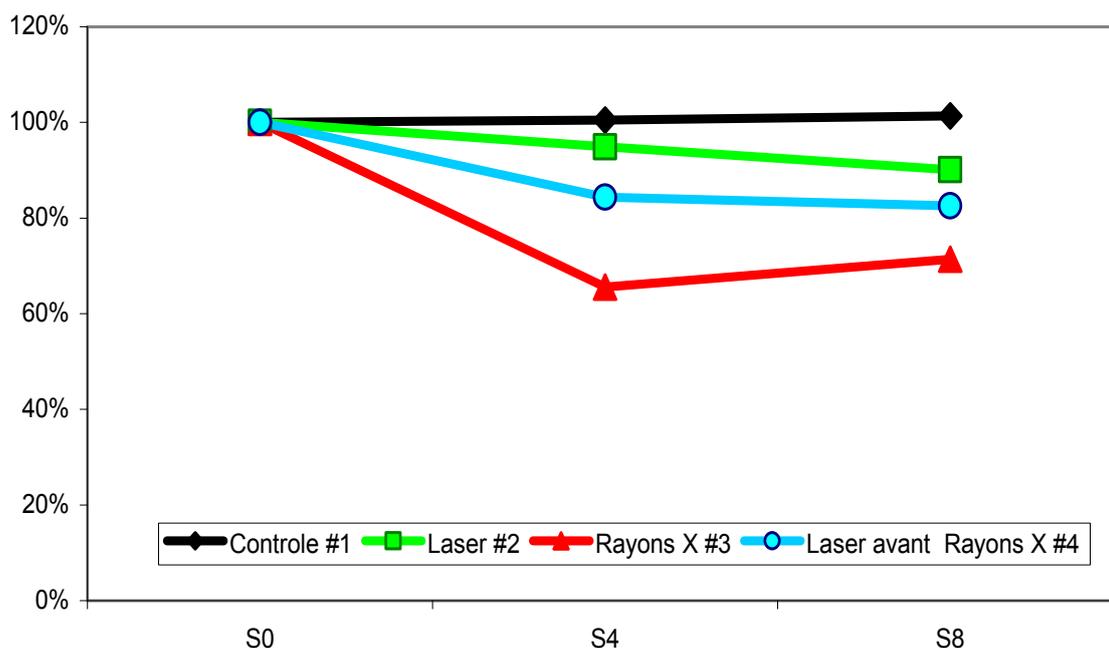


Figure 46: Evolution de la longueur du réseau vasculaire

Concernant l'évolution de la longueur totale du réseau vasculaire (Figure 46), l'analyse intragroupe montre pour:

- le groupe contrôle #1 et le groupe laser #2 : pas d'évolution significative entre S0 / S4 / S8, comme pour le nombre de nœuds
- le groupe rayons X #3 : une chute significative de la longueur du réseau entre S0 / S8:  $p < 0.01$
- le groupe laser avant rayons X #4 : ne montre pas d'évolution significative entre S0 / S4 / S8 comme pour les groupes contrôle et laser

L'analyse statistique intergroupe est possible car l'effet temps n'est pas significatif.

La seule différence significative retrouvée est entre le groupe#1 et le groupe#3 :  $p < 0.05$

L'évolution de la longueur totale du réseau vasculaire montre donc également que le préconditionnement laser semble réduire les effets délétères de l'irradiation aux rayons X (Figure 46). En effet, on n'observe pas de différence significative entre le groupe préconditionnement laser (#4) et les groupes contrôles (#1 et #2).

Le réseau vasculaire est également caractérisé par la distribution des capillaires en fonction de leur taille. L'impact des expérimentations laser et/ou irradiation rayons X est évalué en fonction de la classe de diamètre (Figure 47).

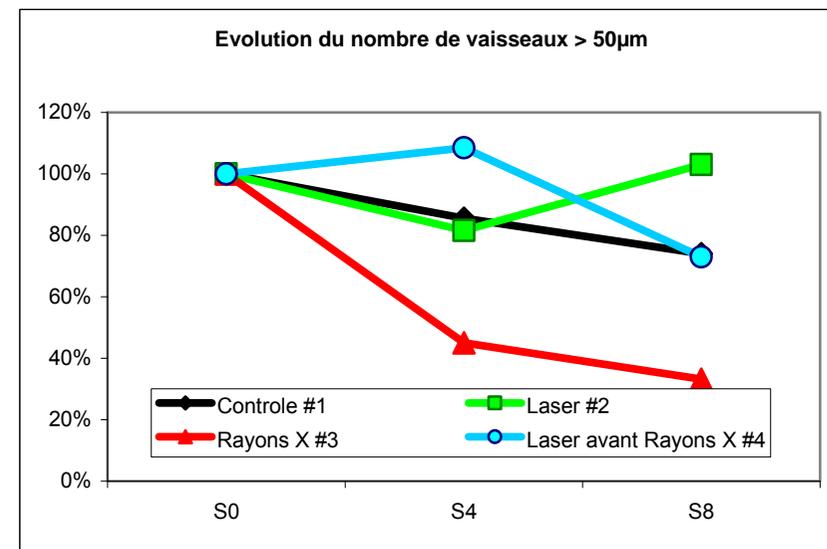
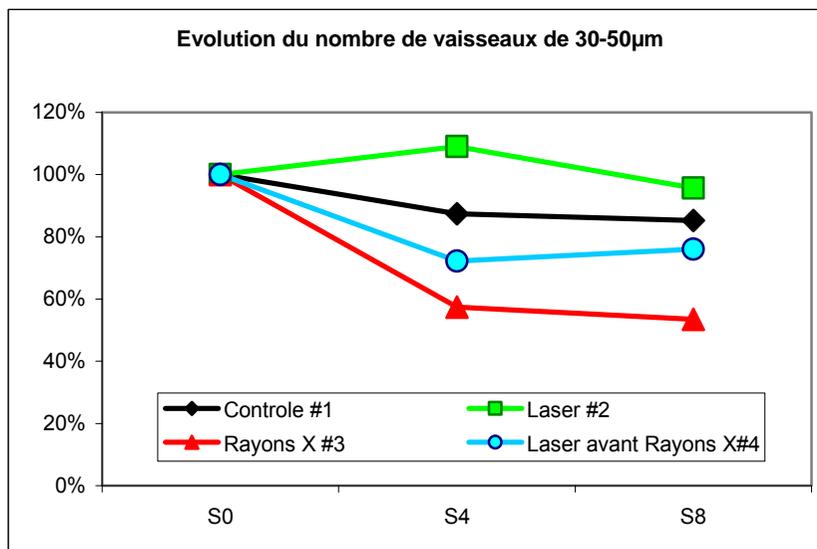
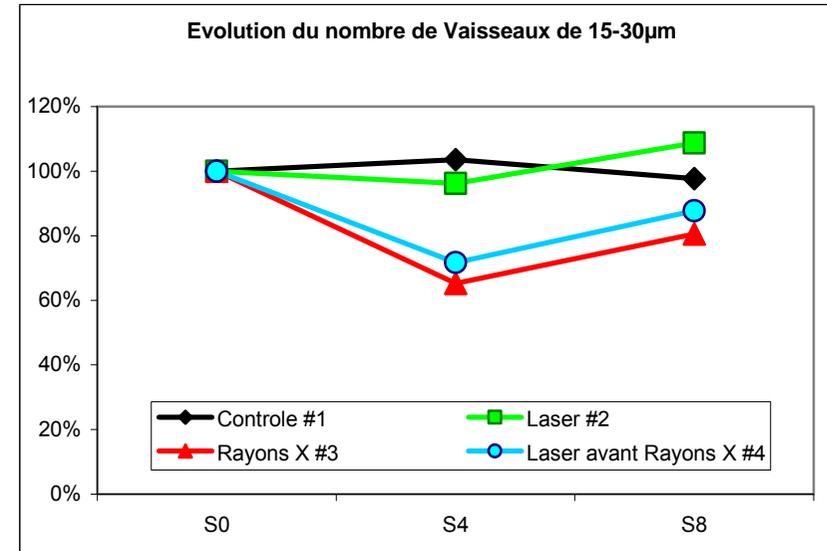
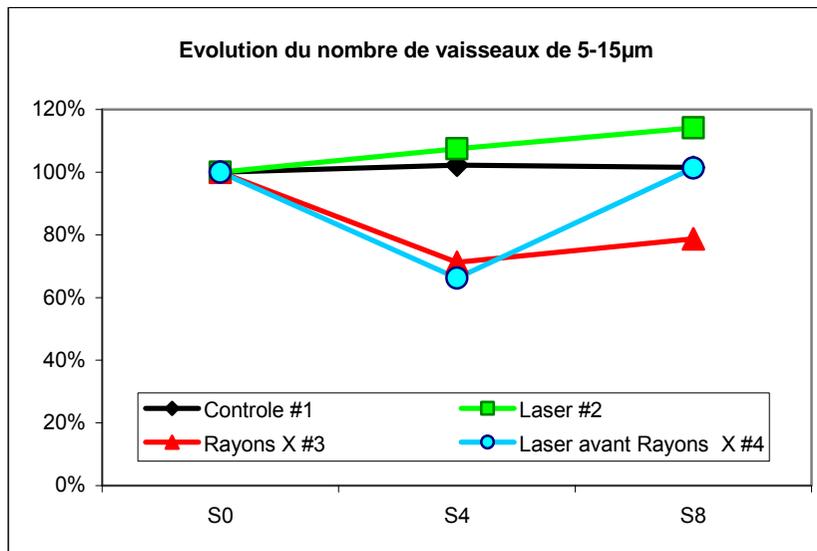


Figure 47: Evolution du nombre de vaisseaux en fonction de leur diamètre

L'analyse statistique intragroupe pour l'évolution du nombre des vaisseaux entre S0 / S8 est présentée Tableau 6:

	<b>Groupe contrôle #1</b>	<b>Groupe laser #2</b>	<b>Groupe rayons X #3</b>	<b>Groupe laser avant rayons X #4</b>
<b>5 – 15 µm</b>	N.S	N.S	P<0.05	<b>P&lt;0.05</b>
<b>15 – 30 µm</b>	N.S	N.S	P<0.01	<b>N.S</b>
<b>30 – 50 µm</b>	N.S	N.S	P<0.001	<b>P&lt;0.01</b>
<b>&gt; 50 µm</b>	P<0.05	N.S	P<0.005	<b>N.S</b>

Tableau 6: Evolution du réseau vasculaire osseux entre S0 et S8

*Analyse statistique des résultats obtenus à partir de Aphelion™, niveau de significativité p<0,05, N.S : non significatif*

L'analyse intergroupe n'est pas réalisée pour l'évolution du nombre de vaisseaux en fonction du diamètre en raison de l'existence d'un effet temps. Nos résultats indiquent cependant une tendance : le groupe préconditionnement laser (#4) présente une réduction du nombre de vaisseaux minime par rapport au groupe irradiation aux rayons X (#3) et ceci quelque soit la taille des vaisseaux.

Une différence particulièrement marquée entre les groupes #3 et #4 est observée pour les vaisseaux de plus gros diamètre (>50 µm). Ainsi, à nouveau, l'analyse statistique ne met pas en évidence d'évolution significative du groupe préconditionnement laser (#4), alors que le groupe irradiation par Rayons X montre une chute hautement significative (p<0.005).

### **6.3.3. Analyse histologique.**

La calvaria du lapin est composée d'une coquille corticale d'os compact très dense entourant un os trabéculaire. Physiologiquement, l'os de la calvaria de lapin est un os plat contenant des capillaires intraosseux autour desquels s'organise la structure concentrique caractéristique des systèmes de Havers comme elle est retrouvée sur le groupe contrôle #1 (Figure 48).

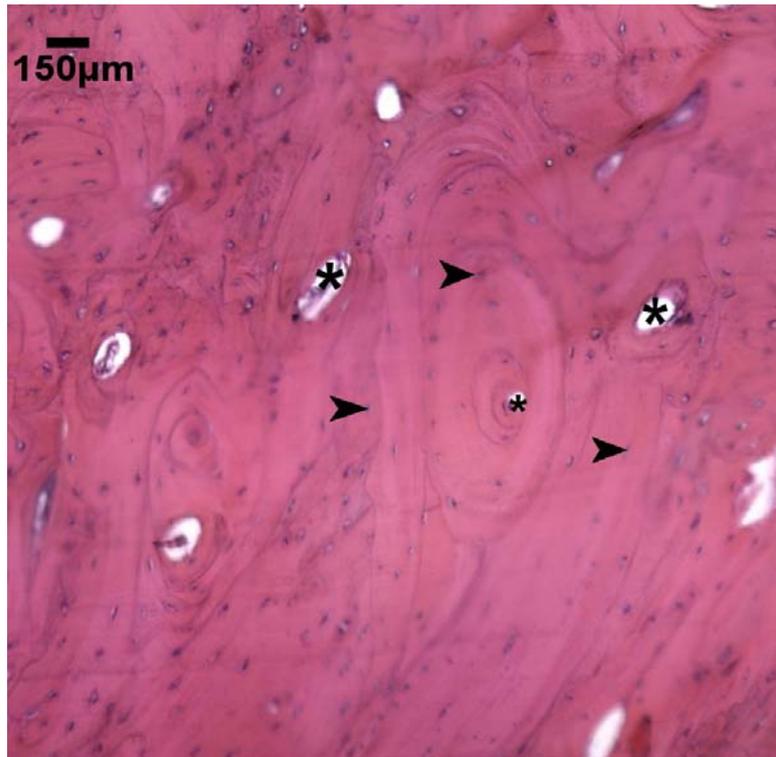


Figure 48: Coupe histologique Groupe #1 (contrôle)

*Présence des noyaux cellulaires des ostéocytes (flèche), des cellules endothéliales des capillaires sanguins (\*) autour desquels s'organisent des systèmes de Havers à la structure concentrique caractéristique. Coloration HES*

Douze semaines après le traitement laser (#2), aucun changement n'est observé au niveau des coupes histologiques du groupe laser (Figure 49). Tous les noyaux cellulaires (ostéocytes et cellules endothéliales) sont présents. La structure haversienne est conservée signant un remodelage osseux physiologique.

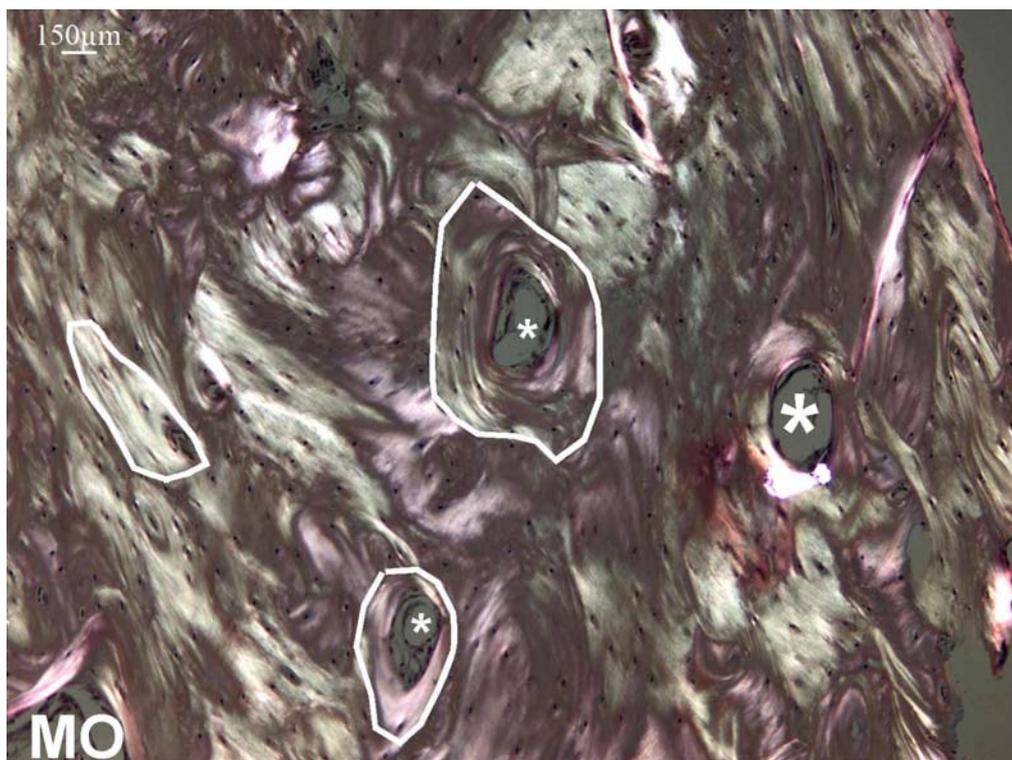
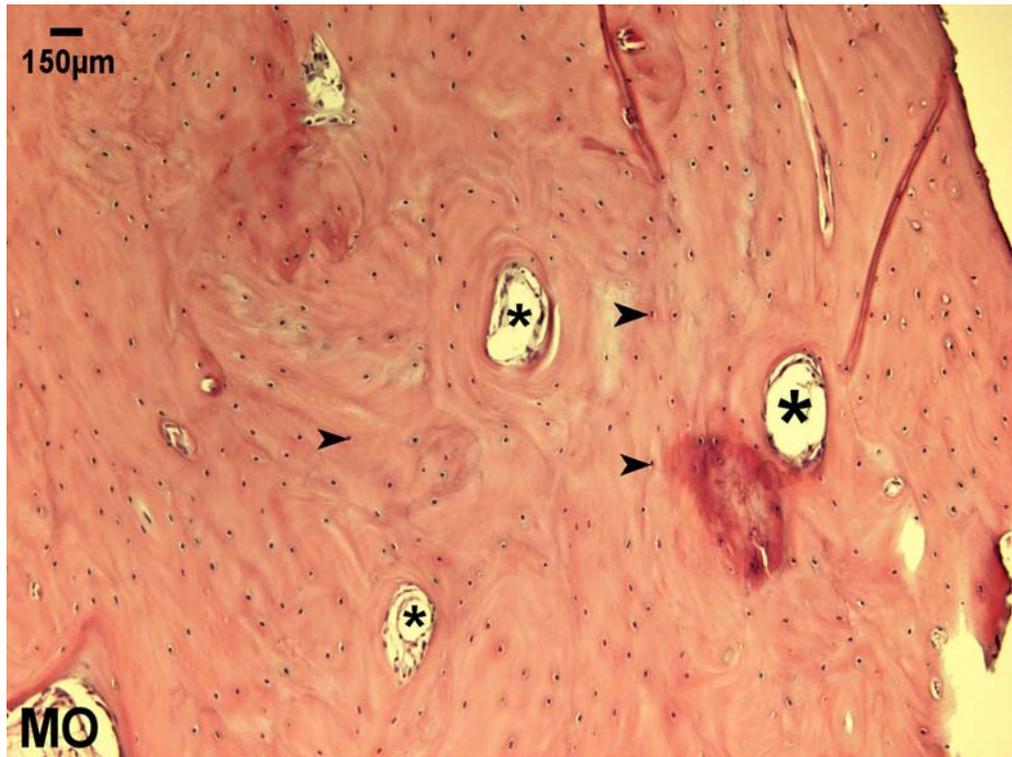


Figure 49: Coupe histologique Groupe#2 (laser)

*Présence des noyaux cellulaires des ostéocytes (flèches), des cellules endothéliales des capillaires sanguins (\*) autour desquels s'organisent des systèmes de Havers à la structure concentrique caractéristique (dessiné à main levée). Coloration HES et lumière polarisée*

Après les douze semaines suivant l'irradiation par rayons X (#3), deux changements pathologiques distincts sont notés dans et autour des canaux haversiens (Figure 50). Le changement prédominant est la présence d'une matrice osseuse non concentrique avec une lacune centrale vide et de diamètre augmenté. La matrice osseuse est désorganisée avec la présence clairsemée de quelques cellules. La majorité des canaux Haversiens est vide et acellulaire. L'irrégularité des systèmes haversiens élargis caractérise un remodelage osseux perturbé. De nombreuses lacunes ostéocytaires sont vides. L'absence d'ostéocytes dans les prélèvements irradiés corrobore définitivement les dommages induits par les rayons X. Il y a peu de signes de régénération osseuse, étant donné l'absence d'ostéoblastes et les ostéoclastes. Le second changement est la diminution du nombre de vaisseaux intraosseux avec une perte de tous les composants cellulaires. Les cellules endothéliales des capillaires ont souvent disparu. La moelle osseuse est pauvre en cellules hématopoïétiques. L'hypochromatisme d'éosine dans certaines régions superficielles de la calvaria indique un épuisement des protéines non-collagéniques acides composant la matrice osseuse. Celles-ci ont été éliminées à la suite de l'irradiation par rayons X. L'absence de polarisation (biréfringence) suggère une réorientation du collagène ou des dommages intra-osseux. Qualitativement, le déficit du remodelage osseux et la dégénération du système vasculaire se retrouvent sur tous les animaux irradiés.

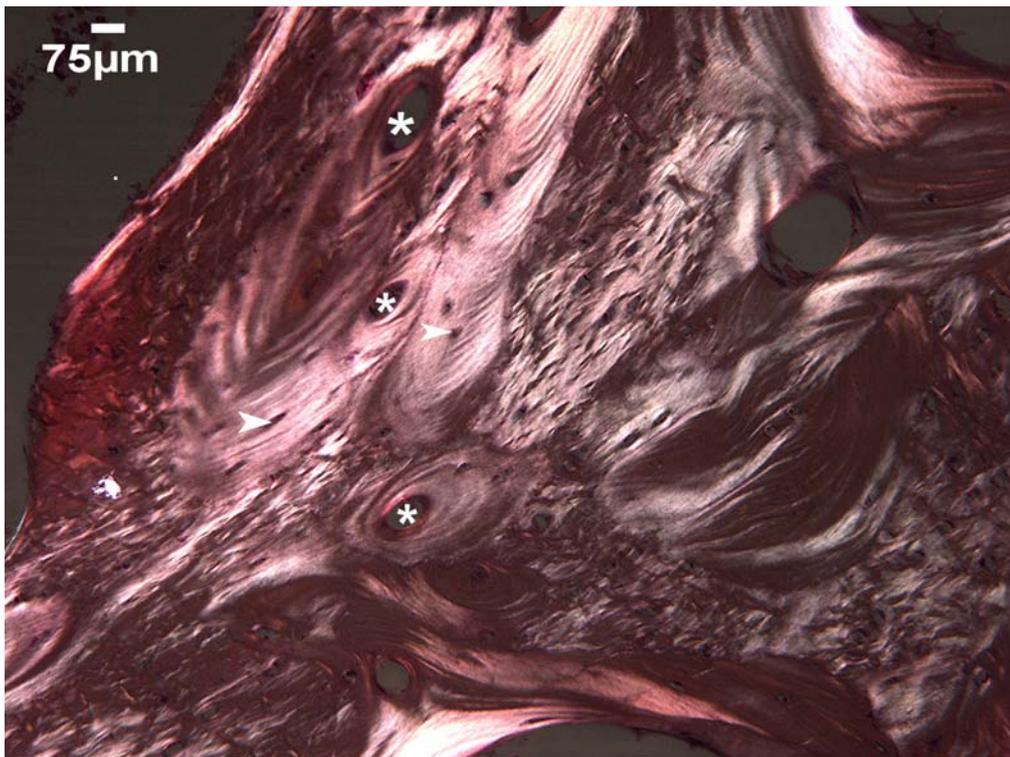
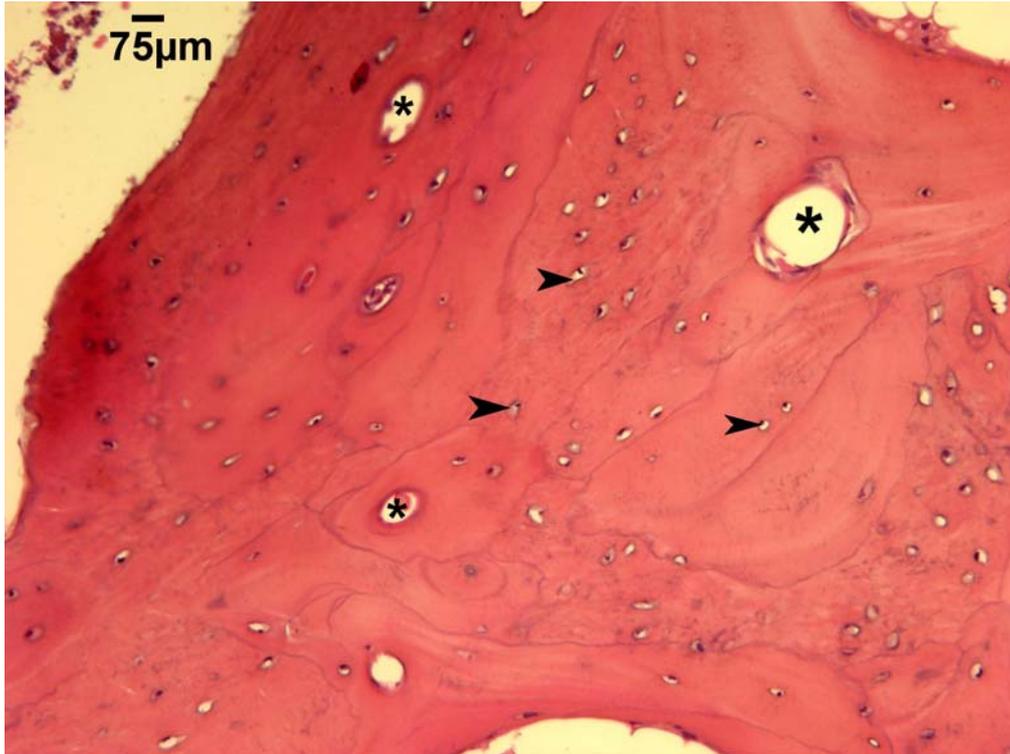


Figure 50: Coupe histologique Groupe#3 (rayons X)

*Lacunes ostéocytaires élargies (flèche), absence de cellules endothéliales dans des canaux de Havers vides (\*), structure osseuse perturbée comme le montre l'absence de biréfringence. Coloration HES et lumière polarisée*

Concernant le groupe laser avant radiothérapie (#4), les mêmes résultats sont retrouvés que pour le groupe témoin et le groupe laser, conservation des éléments cellulaires et stabilité de la structure haversienne (Figure 51). Sur cette coupe, la couche supérieure de la calvaria (directement au contact de la chambre) a été créée de novo comme en témoigne l'écart et le chromatisme de "démarcation" à la frontière de cette couche. En outre, cette couche contient des ostéocytes viables qui suggèrent un remodelage osseux physiologique.

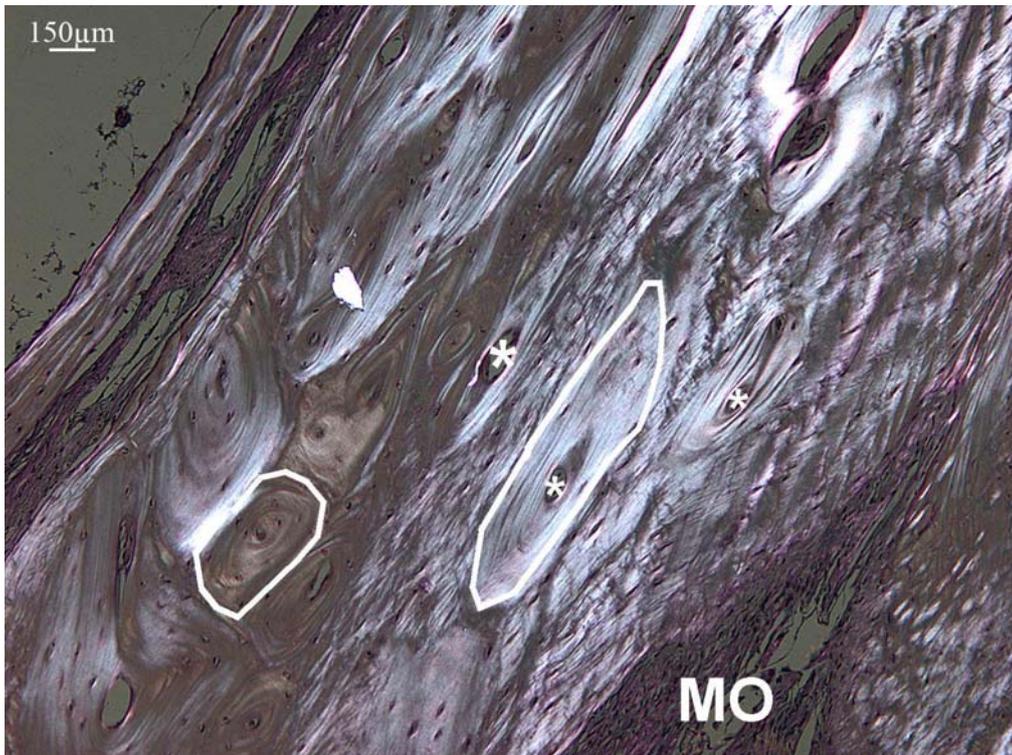
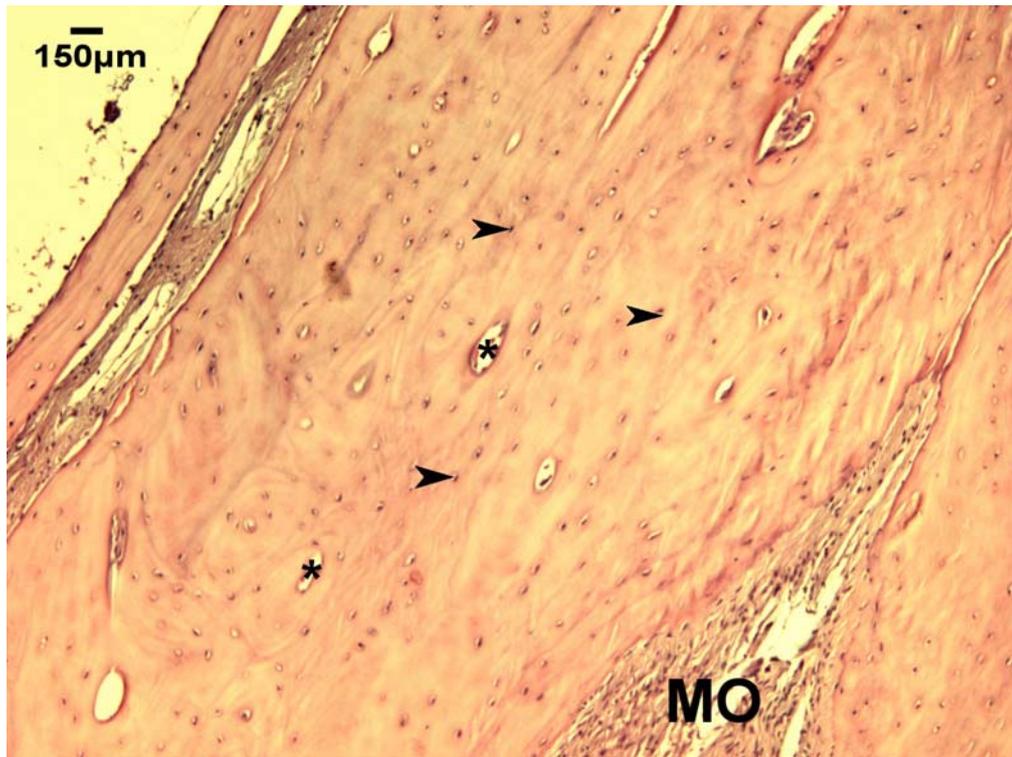


Figure 51: Coupe histologique Groupe #4 (laser avant rayons X)

*Structure histologique osseuse caractéristique. Présence des noyaux cellulaires des ostéocytes (flèches), de cellules endothéliales des capillaires sanguins (\*) autour desquels s'organisent des systèmes de Havers à structure concentrique (dessiné à main levée); MO : moelle osseuse. Coloration HES et lumière polarisée.*

### 6.3.4. Analyse immunohistologique.

L'analyse immunohistochimique montre un marquage positif de HSP70 au niveau du tissu osseux 18h après une irradiation laser (Figure 52). Ce marquage est centré sur le spot d'irradiation laser avec une intensité plus marquée au centre du spot et un gradient des bords de la coupe au centre.

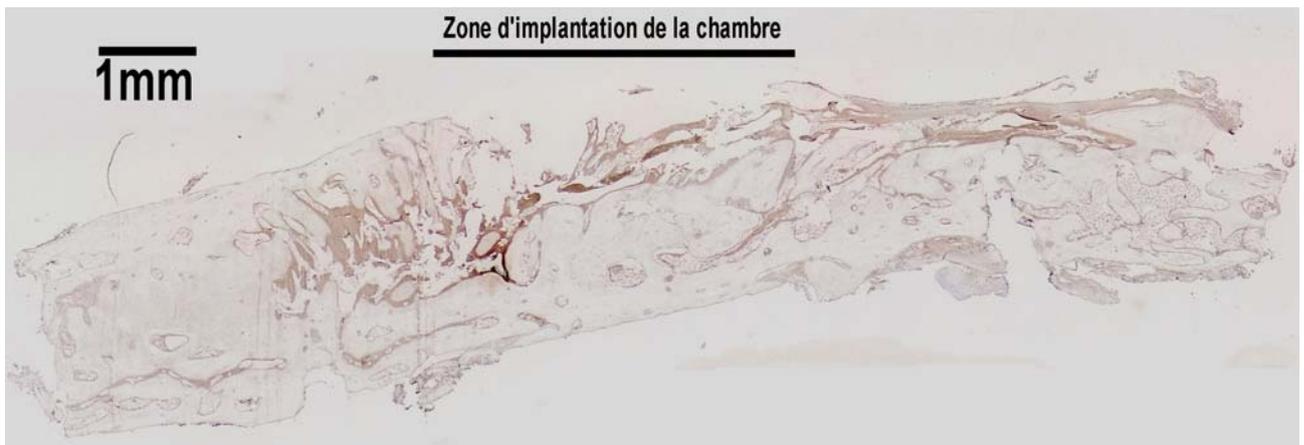
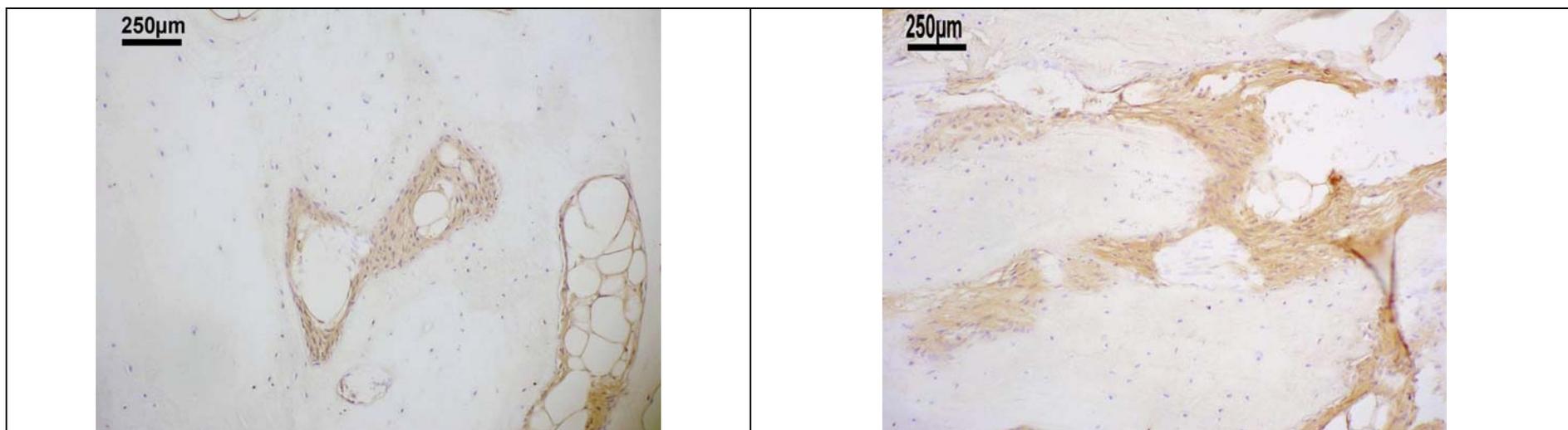
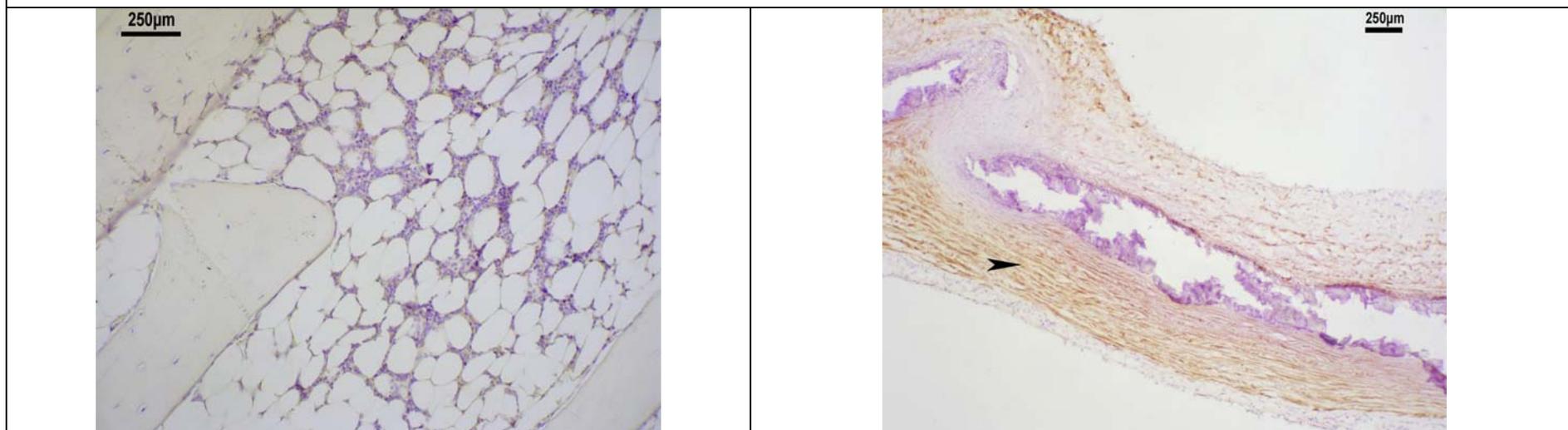


Figure 52: immunomarquage HSP70 d'une coupe de tissu osseux 18h après tir laser  
*Gradient de marquage HSP70 (coloration marron) au niveau de la zone d'application du tir laser. Marquage de l'ensemble des éléments cellulaires et vasculaires.*

Tous les éléments cellulaires présents dans le tissu osseux sont marqués positifs HSP70. La présence de HSP70 n'est pas retrouvée au niveau du contrôle (tissu osseux n'ayant pas eu de traitement laser). Un témoin positif réalisé sur une coupe d'aorte de lapin montre la présence de HSP70 spécifiquement au niveau des cellules musculaires lisses de la média (Figure 53).



Marquage HSP70 du tissu osseux d'un lapin sacrifié 18h après traitement laser. Marquage de l'ensemble des éléments cellulaires présents : cellules endothéliales, cellules du tissu osseux, cellules fibroblastiques.



Os non traité par laser : marquage non significatif

Aorte : marquage HSP70 des cellules musculaires lisses (flèche)

Figure 53: Immunomarquage HSP70 sur tissu osseux

## **7. DISCUSSION**

Notre travail vise à évaluer les effets d'un préconditionnement laser appliqué en site osseux irradié par rayons X. Après le choix de nombreux paramètres : mise au point d'un modèle animal, paramétrage d'un traitement laser préconditionnant, mise en place d'un dommage osseux par irradiation par rayons X, nous les avons mis en application pour un suivi *in vivo* du réseau vasculaire osseux. Notre modèle animal évalue l'évolution du réseau vasculaire osseux de manière reproductible ce qui nous a permis d'étudier l'influence de différents stress sur la cicatrisation osseuse. Notre travail préliminaire valide le laser comme étant une méthode de chauffage finement contrôlée. L'étude *in vivo* montre que le traitement laser préserve la vascularisation en site osseux irradié. Le second volet de l'étude est une analyse immunohistochimique qui met en évidence la production de HSP70 parallèle à la distribution thermique. Ainsi, le préconditionnement Laser préserve la vascularisation osseuse superficielle des dommages induits par le biais de l'irradiation aux rayons X.

## **7.1. Le modèle**

### **7.1.1. La zone observée**

Notre modèle permet la caractérisation sur un même animal d'un réseau vasculaire en site osseux et son suivi avec un minimum d'artéfacts grâce à une technique d'observation non invasive. L'observation *in vivo* s'est avérée être une approche fiable pour étudier longitudinalement les paramètres vasculaires (Winet et coll. 1990; Leunig et al. 1994). Il existe peu de modèles d'observation *in vivo* de la vascularisation du tissu osseux. L'un des premiers modèles décrits est celui de Winet. Ce modèle d'étude est transfixiant au niveau d'un tibia de lapin et nécessite la création d'un large défaut osseux, la zone observée est une zone cicatricielle (Winet et coll. 1990). Hansen-Algenstaedt et al. ont proposé plus récemment un modèle d'observation de la vascularisation intraosseuse du fémur de souris par transillumination (Hansen-Algenstaedt et coll. 2005). Ces modèles s'intéressent aux os longs, leur protocole chirurgical est difficilement adaptable aux os du massif facial. De plus, les caractéristiques d'ossification sont différentes des os membraneux (Cf. Chap.2). Il semble alors utile de développer notre propre modèle à partir du modèle existant (Penel et al. 2005) en prenant en compte les critères d'évaluation des modèles précédemment décrits.

Une question soulevée par notre modèle est la localisation des vaisseaux sanguins visualisables sous la chambre optique. Elle a fait l'objet de différentes approches, en effet l'analyse de l'interface est extrêmement difficile.

Le premier constat est donné par les résultats histologiques, la chambre est posée en site osseux. Le périoste est réséqué pendant la phase chirurgicale. La pose de la chambre déclenche la cascade de cicatrisation osseuse et l'expérimentation est conduite en fin de processus lorsque le réseau vasculaire est stable. Les coupes histologiques réalisées après dépose de la chambre optique corroborent la localisation en site osseux cortical. La vascularisation observée est donc superficielle et directement reliée avec la vascularisation intracorticale (cf. Figure 54).

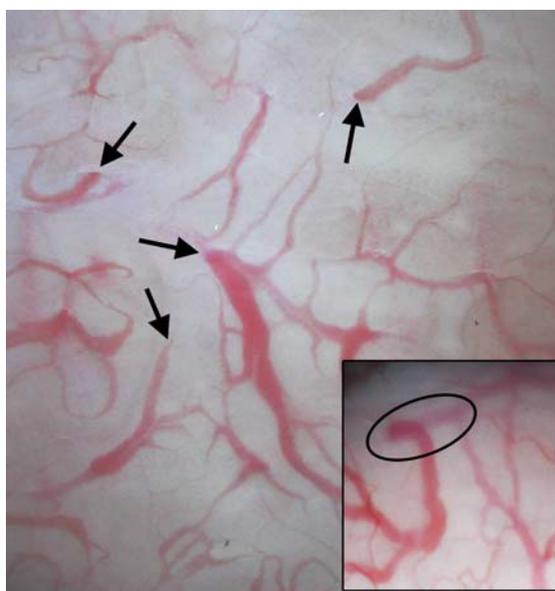


Figure 54: Emergence de vaisseaux sanguins (flèche) observée sur différentes zones d'une image numérique échelle\*2

L'observation attentive des clichés montre l'émergence de vaisseaux sanguins des couches sous-jacentes (Figure 54). Il est également possible d'identifier différents types de vaisseaux: des vaisseaux très superficiels (au contraste élevée) et d'autres situés plus en profondeur (plus clair sur les images). La profondeur de champ de l'appareil photographique est de l'ordre du millimètre. Les vaisseaux observés sont donc sur différents plans dans un même site osseux.

Afin de localiser ces vaisseaux plus précisément et comme la dépose de la chambre induit une disparition de l'interface, des coupes histologiques de la chambre implantée sur le tissu sous-jacent ont été réalisées. Cette technique de coupe particulière nécessite une

déshydratation du prélèvement et son inclusion dans de la résine qui ne sont pas sans conséquences sur l'interface. Cependant, on retrouve l'intimité du contact entre la chambre et le site receveur. Ceci suggère également que l'ensemble du réseau vasculaire observé est osseux mais qui ne permet cependant pas de préciser son origine.

L'analyse Raman permet une caractérisation des matériaux présents à différentes profondeurs grâce à la variation du point d'analyse selon l'axe Z (cf. Figure 34). La présence simultanée des spectres de l'hémoglobine et des éléments constitutifs du tissu osseux corrobore les résultats précédents. En effet, en spectrométrie Raman, lorsque le faisceau laser excitant est directement focalisé sur un vaisseau, l'hémoglobine absorbe l'énergie du faisceau et bloque donc ce dernier, le spectre obtenu est alors limité à la bande de l'hémoglobine ( $754\text{ cm}^{-1}$ ). Or, on retrouve également les bandes caractéristiques des phosphates et des carbonates constituant le tissu osseux. Le faisceau laser a donc rencontré ces structures avant d'être absorbé par l'hémoglobine. L'analyse de la coupe en Raman quantifie une épaisseur de résine à l'interface de l'ordre de  $10\mu\text{m}$ . Par conséquent, le réseau vasculaire observé est donc localisé en milieu osseux.

Il ne s'agit toutefois que du réseau de surface corticale et pas du réseau médullaire, ce qui constitue une caractéristique de notre modèle.

### **7.1.2. La méthode d'analyse**

Notre modèle permet un enregistrement des données sans préparation particulière de l'animal. Ceci représente deux atouts majeurs : une facilité relative de mise en œuvre, une absence de limitation à répéter l'observation et une absence d'artéfact lié à l'acquisition des images et aussi la limitation d'éléments extérieurs qui pourraient avoir un impact sur les résultats obtenus. Ainsi notre modèle nous permet une observation d'un site osseux selon des conditions les plus proches possibles de la physiologie.

Lors de l'analyse des images, seul le positionnement de la région d'intérêt (ROI) est opérateur dépendant, l'analyse est donc semi-automatique. De plus, ce biais est limité par le fait que toutes les analyses d'images sont faites par le même opérateur et que la ROI est un cercle centré sur une fenêtre elle-même ronde facilitant le repositionnement.

Par ailleurs, notre cohorte présente un réseau vasculaire hétérogène inter individu. La normalisation de nos résultats nous affranchit de cette variabilité de l'architecture vasculaire. En effet, notre étude s'intéresse uniquement à l'évolution des données vasculaires dans le temps et en aucun cas à l'interprétation de leur valeur brute. Il s'agit de comparer les réponses vasculaires en fonction des différents stress appliqués comme cela a déjà été réalisé dans d'autres études sur la néovascularisation osseuse (Winet et al. 1990).

### **7.1.3. La tolérance de la chambre optique**

L'os est un tissu vivant en remodelage continu. Cette transformation constante est étroitement liée à l'angiogénèse et donc au système vasculaire osseux (Carano and Filvaroff 2003). La cicatrisation osseuse nécessite environ 6 semaines chez le lapin. Le turnover osseux du lapin est deux à trois fois plus rapide que celui de l'homme. (Lopes et coll. 2005). Ainsi la durée de notre étude (12 semaines) couvre 2 cycles de remodelage, les effets des différents stimuli appliqués au travers de la chambre optique sont donc observés à long terme. De plus, certaines chambres optiques ont été implantées pendant près de deux ans, nous n'avons observé aucun phénomène de rejet, d'infection ou d'intolérance pendant toute la durée de notre étude. La stabilité de l'architecture vasculaire du groupe contrôle (groupe #1) confirme la bonne tolérance de la chambre optique. L'étude de la densité vasculaire de ce groupe ne met pas en évidence d'évolution significative.

La pose de la chambre optique induit une phase de cicatrisation qui se traduit dans un premier temps par la présence d'un hématome sous la chambre qui se résorbe en 2 à 3 semaines. Puis, une instabilité du réseau vasculaire perdure de 2 à 4 semaines. Ceci a également été décrit par Winet et al. qui ont travaillé sur la cicatrisation d'un défaut osseux sur tibia de lapin. Ils montrent une reprise de la vascularisation 3 semaines après l'intervention. Puis durant 5 semaines, ils observent une lyse des gros vaisseaux au profit de petits capillaires qui favorisent l'échange de nutriments nécessaire à la cicatrisation. La fin de cette phase se caractérise par la diminution du nombre de vaisseaux sanguins, l'augmentation de leur diamètre et une stabilité du réseau (Winet et al. 1990). Ohtsubo et al décrivent le même type de résultats lors de l'étude de la cicatrisation osseuse pariétale après l'implantation d'os lyophilisé sur des rats. (Ohtsubo et al. 2003).

Une fois cette phase stable atteinte, elle perdure au long court si aucun stress extérieur n'est appliqué comme le montrent les résultats du groupe #1. Les faibles variations ponctuelles de la densité vasculaire semblent dues aux modifications transitoires physiologiques (cycle hormonal) et/ou environnementales (variations des températures, stress extérieurs). Seules les fortes modifications à court terme et l'aspect général de la courbe à long terme correspondent à des modifications réelles de la vascularisation comme le montre l'analyse statistique.

### **7.1.4. Limites du modèle**

Comme toute méthode d'observation, notre modèle a ses propres limites. En premier lieu l'implantation sur la calvaria de la chambre optique n'est pas strictement standardisée. Elle

est posée sur la suture sagittale après une incision réalisée sur le méplat de la calvaria en l'absence de repérage stéréotaxique. De plus la profondeur de l'implantation de la chambre et donc sa localisation intra osseuse ne sont pas connues avec exactitude puisque le fraisage est réalisé manuellement pour obtenir un contact osseux optimal. Il n'est donc pas strictement reproductible d'un lapin à l'autre.

Par ailleurs, le contact entre la fenêtre de la chambre et l'os sous jacent est plus ou moins étroit en fonction de l'implantation de la chambre. Ce qui explique que sur certains animaux, la dépose de la chambre optique met en évidence la présence d'un tissu recouvrant partiellement ou totalement la zone d'observation qu'il est difficile de prélever et par conséquent de caractériser. Le développement de ce tissu peut faire suite à un défaut d'intégration du système et aurait un rôle mécanique d'amortisseur et d'herméticité. Il peut également résulter de la cicatrisation du périoste réséqué lors de la chirurgie. Notre zone d'observation est donc un site osseux membraneux cicatrisé et en cours de remodelage.

## **7.2. Le Laser**

### **7.2.1. Le laser : un moyen de chauffage fiable**

Nos travaux montrent que Le laser utilisé dans des conditions précises a un effet sur la cicatrisation osseuse. Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature des travaux équivalents. Cependant, l'action pro cicatrisante du laser sur le tissu osseux a déjà été évoquée. Dès 1986, Tang et al. étudient les effets d'une irradiation quotidienne au laser CO<sub>2</sub> de faible puissance (irradiance 236 mW/cm<sup>2</sup> pendant 10 minutes, soit une fluence de 142 J/cm<sup>2</sup>) sur la cicatrisation d'une fracture osseuse expérimentale chez le lapin. Ils observent une résorption plus rapide de l'hématome créé lors de la fracture, un débridement accéléré des tissus nécrotiques, une augmentation de l'angiogénèse avec apparition précoce des cellules ostéogéniques et donc une cicatrisation accélérée (Tang et coll. 1986).

En 2003, Ninomiya et al. montrent par analyse histomorphométrique que l'irradiation par laser 1064 nm Nd:YAG augmente la formation d'os trabéculaire sur un fémur de rat. Les groupes ayant subi un traitement laser ont une augmentation du volume osseux trabéculaire et du taux d'apposition minérale. Cette formation dépend directement de la puissance et de la durée de l'irradiation. Ainsi deux paramétrages sont testés: un tir de irradiance 100 mW/cm<sup>2</sup>, ou deux tirs espacés de 12heures avec une irradiance de 50 mW/cm<sup>2</sup> La durée du tir n'étant pas précisée, il est difficile d'apprécier l'impact thermique du tir laser. Cependant, le groupe ayant

subi deux tirs espacés de 12h montre le volume osseux trabéculaire et le taux d'apposition minérale les plus importants (Ninomiya et coll. 2003).

En 2004, Pourzarandian et al. observent une accélération des premiers stades de la cicatrisation lors d'une excision osseuse de calvaria de rat réalisée avec un laser 2.94  $\mu\text{m}$  Er:YAG en mode discontinu (durée de l'impulsion 200  $\mu\text{sec}$ , avec une puissance de 100 mJ/impulsion sous une fréquence de 10 Hz (1W)) sous irrigation. L'irrigation refroidit le tissu et élimine la couche carbonisée créée par la chaleur du rayonnement laser. Ceci permet l'attachement de nombreux composants de la matrice extracellulaire sur la surface traitée, une réponse inflammatoire contrôlée, une prolifération des capillaires accélérée et donc une stimulation de la cicatrisation (Pourzarandian et coll. 2004).

Cependant, ces travaux n'ont pas appliqué le laser comme un moyen de chauffage précis et quantifiable, capable d'induire un stress thermique contrôlé. Les paramètres des tirs laser appliqués n'étant que partiellement décrits, il est difficile d'en évaluer l'impact thermique.

Différentes méthodes de chauffage ont été décrites mais très peu sont applicables à notre modèle d'étude osseux. L'application d'une source de chaleur extérieure en contact direct avec le tissu telle qu'elle a déjà été décrite (Topping et al. 2001; Kim et al. 2004) est difficilement concevable sur le tissu osseux et implique également un chauffage inhomogène avec un pic de température au contact de la source. Or, un chauffage homogène et précis est requis pour induire une production de HSP (cf. Figure 5), ces solutions sont donc écartées.

L'utilisation d'un système de chauffage par ultrasons est également retrouvée dans la littérature. Cependant, une étude de Lu et al. montre que, en dépit d'une haute absorption des ultrasons par le tissu osseux, il est difficile d'induire une forte hausse de la température dans la corticale osseuse (Lu et coll. 2000). En outre, la distribution de la chaleur induite par ultrasons, micro-ondes et laser 815nm a été comparée. Il en ressort que la lumière laser 815nm diffuse sur une zone limitée en distance autour de la source du fait qu'elle se disperse fortement dans le tissu contrairement aux micro-ondes et aux ultrasons. De plus, l'énergie délivrée par le laser chute plus rapidement en comparaison avec les micro-ondes et les ultrasons du fait d'un coefficient d'atténuation de la lumière plus important pour le laser (Skinner et coll. 1998). Contrairement aux autres techniques, le laser permet donc un chauffage des tissus sans contact, très précis et de façon reproductible en comparaison aux autres sources de chaleur (Capon and Mordon 2003). La distribution de la chaleur dans le tissu osseux plus importante en profondeur, au centre du spot (cf. Figure 10) s'explique par une diffusion de proche en proche et une perte d'énergie en surface. Cette distribution peut être superposée à la production de HSP, en effet le marquage de HSP70 est plus important au centre du spot (Figure 52).

## 7.2.2. Paramétrage du laser

Dans notre étude, le système diode laser 815nm a été choisi afin d'obtenir un préconditionnement thermique car il fournit un chauffage contrôlé dans le tissu osseux (Ninomiya et al. 2003).

Lors de la première phase de l'étude, les paramètres du tir laser (1,5 W pendant 3sec) permettent une augmentation de température de l'ordre de celle définie par O'Connell-Rodwell et al. pour induire une réponse à un choc thermique. Cependant, leurs résultats sont obtenus à partir de culture cellulaire et non pas sur tissu minéralisé comme pour notre étude (O'Connell-Rodwell et al. 2004). Néanmoins, ces paramètres permettent un accroissement de la température tissulaire en restant sous la température critique d'apoptose définie par Eriksson et al. (Eriksson and Albrektsson 1983). Les premiers résultats montrent que le laser est un moyen de chauffage très précis et reproductible, avec une distribution gaussienne du centre du spot vers les bords (Figure 39). La corrélation entre nos mesures de températures expérimentales et la modélisation informatique nous permet un paramétrage précis de la puissance du tir laser. Les résultats de la modélisation mathématique ont un profil comparable avec les résultats obtenus pendant l'expérimentation. Cependant, ils ne sont pas exactement superposables (cf. Figure 55). Les valeurs mesurées au puit A en jaune (0,7 mm de profondeur) et au point B en rouge (1,5mm de profondeur) sont représentées +/- écart type. Elles sont superposées pour le tir à 1W. Les données issues de la modélisation montrent une décroissance moins rapide que les mesures expérimentales.

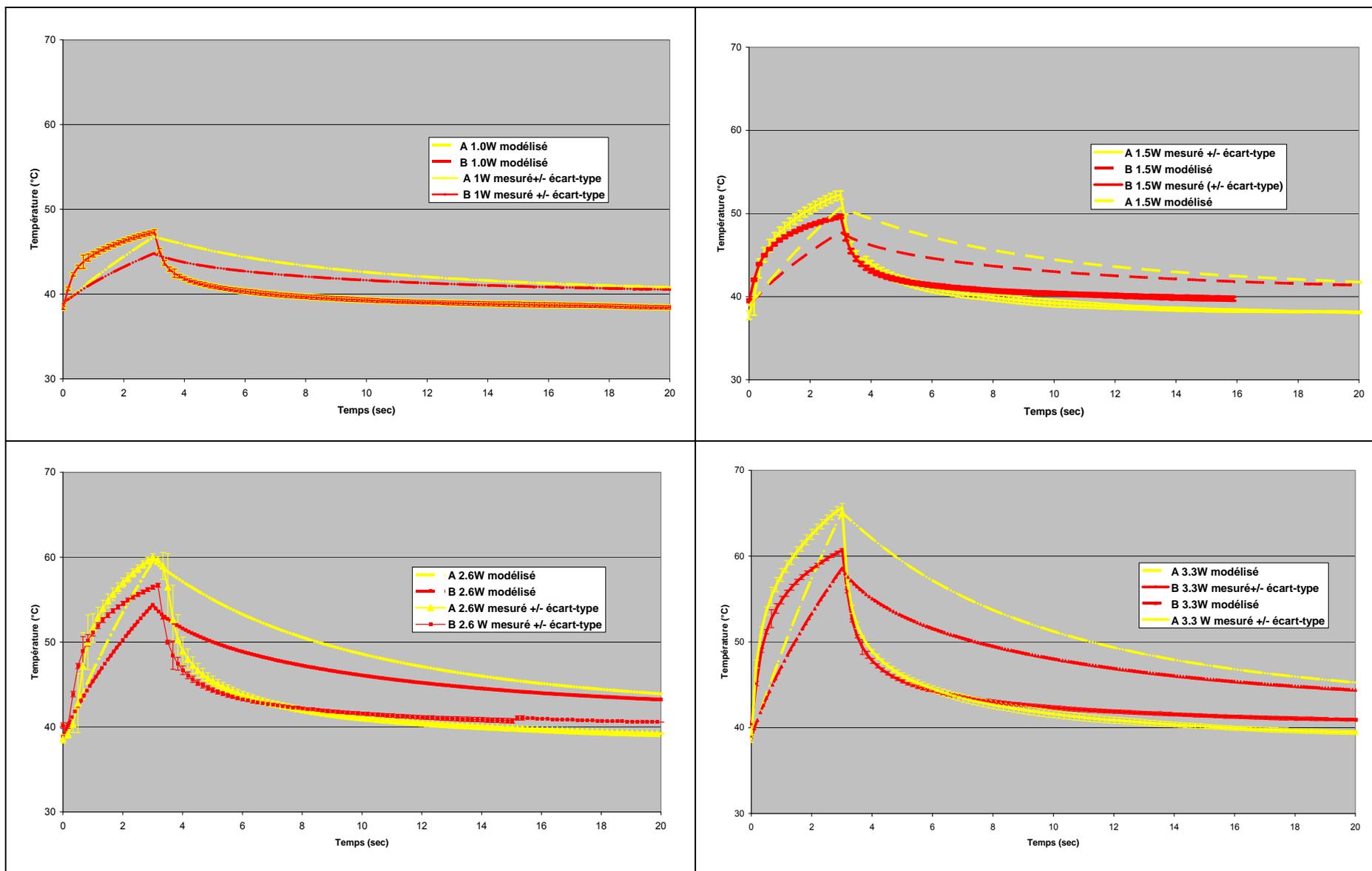


Figure 55: Evolution de la température osseuse selon la puissance du tir laser: Modélisation mathématique et mesures.

Les conditions expérimentales sont une explication possible à la discordance entre les valeurs modélisées et mesurées. Le positionnement précis du thermocouple au sein d'une petite pièce osseuse est très difficile en profondeur (selon l'axe Z) ainsi que de le centrer au niveau du spot laser (plan XY). Or comme le montre la distribution spatiale de la chaleur, un mauvais centrage peut être à l'origine d'un biais d'enregistrement de température. De plus, pour une si faible épaisseur de tissu osseux, l'environnement influence nettement, ce qui n'est pas le cas lors de la modélisation. La décroissance de la température après le tir laser est plus rapide lors des mesures expérimentales. En effet, le paramétrage laser est réalisé sur un os sec d'environ 2 mm d'épaisseur plongé dans un thermobain. L'eau étant un très bon conducteur, la décroissance après le tir laser est donc plus rapide expérimentalement qu'avec le modèle mathématique. Malgré cette discordance, le modèle mathématique reste un outil très utile pour simuler et mieux comprendre le profil de la distribution de la chaleur dans le tissu osseux.

De plus, il existe une variabilité de températures entre le domaine *in vivo* et nos mesures réalisées sur os non vascularisé. Cependant, Svassand et al. ont montré que pour des durées de chauffage inférieures à une dizaine de secondes, le transfert de chaleur *via* les vaisseaux sanguins n'intervient pas (Svaasand et al. 1985).

Le traitement laser (groupe #2) induit une variation non significative de la DV sur le long terme, il en est de même pour les critères morphologiques. L'analyse histologique à 24h et à 12 semaines corrobore ces résultats, aucune modification histologique n'est mise en évidence. Ainsi, en site osseux sain un tir laser d'une fluence de 36J/cm<sup>2</sup> n'induit pas de dommages appréciables au niveau osseux. La stabilité vasculaire valide définitivement notre paramétrage laser.

### **7.3. L'effet du préconditionnement laser sur la cicatrisation osseuse**

#### **7.3.1. Effet de l'irradiation par rayons X**

Avant de s'intéresser à l'impact du laser sur la cicatrisation osseuse, quelques points concernant le protocole de lésion par rayons X doivent être précisés.

Nos résultats indiquent que l'irradiation par rayons X (groupe #3) induit une diminution marquée de la vascularisation, qui persiste au moins pendant les 12 semaines de l'étude. Nos données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature qui décrit la toxicité des rayonnements X et leurs effets anti-angiogéniques sévères et chroniques (Marx 1983; Okunieff

et al. 1998; Muhonen et al. 2004). Ainsi, après irradiation aux rayons X de 18.75 Gy, on observe une réorganisation complète de la cartographie vasculaire osseuse. Les dommages vasculaires se traduisent par une baisse significative du nombre de nœuds, de la longueur totale du réseau vasculaire et du nombre de vaisseaux quelque soit leur diamètre. Ces modifications ont été expliquées par une hyperconstriction des larges vaisseaux (>50 µm) liée à la vasoconstriction sur les cellules musculaires lisses de la media une semaine après l'irradiation (Hirakawa et coll. 1995) La constriction artérielle résulterait également d'une prolifération des cellules endothéliales et donc d'une hyperplasie de l'intima (Hopewell et coll. 1978). Au niveau capillaire, des études ont décrit un épaissement de la paroi en première intention suivi par des effets à long terme sous forme de thrombose. On observe également une diminution du nombre de cellules endothéliales dans les parois vasculaires (O'Connor et coll. 2000). L'irradiation par rayons X modifie la microvascularisation dans les tissus mous. Ces changements sont caractérisés par une oblitération des petits vaisseaux (radiosensibilité accrue des cellules endothéliales) et un remaniement des larges vaisseaux (radiosensibilité relative des cellules musculaires lisses) (Dimitrievich et coll. 1984; Fischer-Dzoga et coll. 1984). Ces résultats ont été observés sur les parois des artères (>500µm). Le système vasculaire cortical est beaucoup plus fin, les plus gros vaisseaux étant de l'ordre de 100µm. Nos résultats sont donc difficilement superposables. Nos observations montrent une chute du nombre de vaisseaux avec un réseau plus court et qui couvre moins bien la surface osseuse (chute du nombre de nœuds). La chute prépondérante du nombre de vaisseaux >50µm peut s'expliquer par la diminution générale du diamètre des vaisseaux. Les plus larges changent alors de classe et compensent ainsi la diminution observée dans les classes inférieures. L'objet de cette irradiation par rayons X est de lésier le réseau vasculaire observé de façon reproductible et quantifiable. Nos résultats valident l'utilisation des rayons X comme outil d'agression vasculaire sur le site observé.

### **7.3.2. Impact du préconditionnement laser**

Enfin, le préconditionnement thermique semble préserver le système vasculaire des effets de l'irradiation par rayons X comme l'illustre la Figure 56.

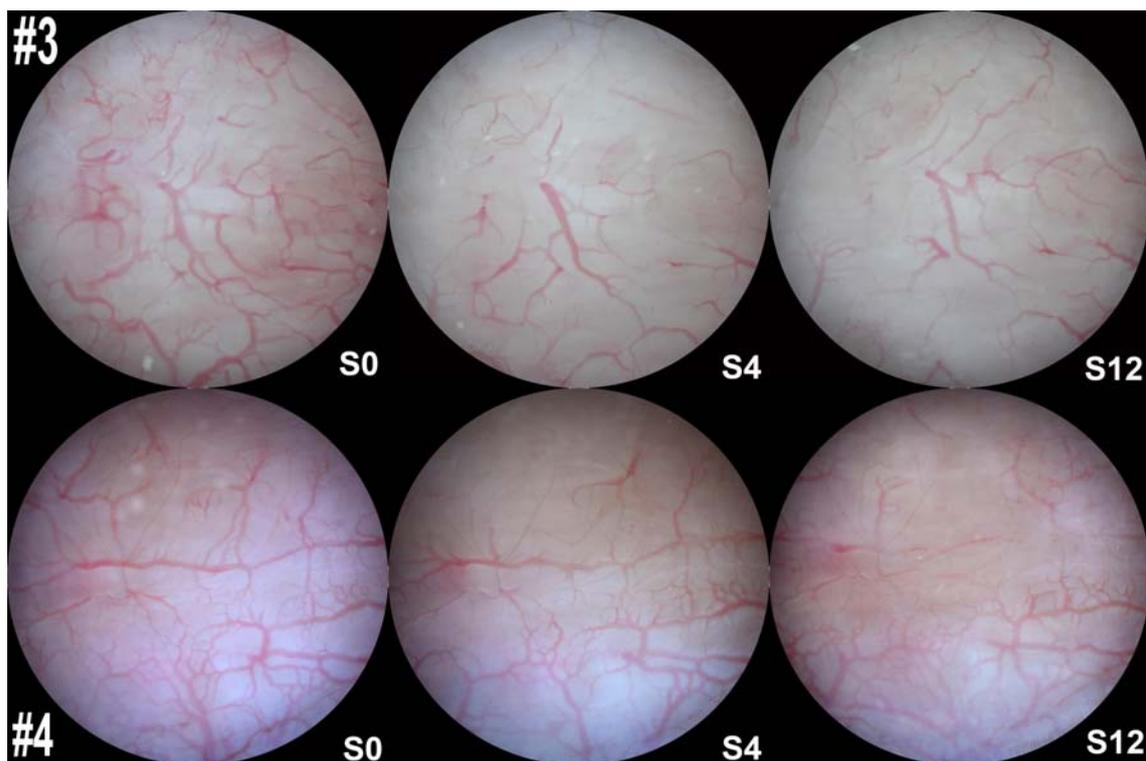


Figure 56: Comparaison de l'évolution du réseau vasculaire de lapin des groupes #3 et #4

Figure 56(#3): Groupe # 3 ayant reçu une irradiation par rayons X (18,75 Gy).

*Une réduction des capillaires de grande taille est associée à une disparition du réseau vasculaire le plus fin (S4). Dans une deuxième phase, une recrudescence lente et progressive de la densité vasculaire est observée. Une nouvelle architecture vasculaire s'organise et se stabilise à la semaine 12 (S12).*

Figure 56(#4): Groupe # 4 préconditionnement laser (36 J/cm<sup>2</sup>) 24 heures avant l'irradiation par rayons X (18.75 Gy).

*Le réseau vasculaire se contracte mais les plus gros capillaires restent présents (S4). On observe une réorganisation du fin réseau vasculaire à partir des vaisseaux principaux. À la semaine 12, la nouvelle architecture du réseau vasculaire est très similaire à son organisation initiale (S0).*

Nos résultats montrent que la diminution de la densité vasculaire est minimisée dans le groupe #4. Des travaux ont montré que le préconditionnement thermique à type de chauffage était une méthode adaptée pour réduire les dommages occasionnés lors d'une blessure secondaire (Harder et coll. 2004; Kim et al. 2004; Contaldo et coll. 2007). Le préconditionnement laser induit un effet protecteur au niveau vasculaire en particulier pour les vaisseaux les plus larges. La mise en condition obtenue par le laser pourrait induire une « Heat Shock Response » (HSR) comme nous l'avons décrit au chapitre 3.3 (Perdrizet 1997). En effet, la production de HSP70 après stimulation par le laser a été mise en évidence en

immunohistochimie. Le préconditionnement laser semble donc induire un changement du métabolisme qui vise à protéger la cellule. Cette modification est rapide et transitoire, ce qui pourrait expliquer que l'irradiation laser n'a aucune manifestation vasculaire à long terme, comme observé dans le groupe # 2. La HSR est une explication plausible pour des différences observées entre les groupes #3 et #4. Comme nous l'avons exposé précédemment, plusieurs études démontrent que l'application d'un stress contrôlé favorise la survie tissulaire lors d'une seconde agression critique (Perdrizet 1997; Kelyt et al. 2002; Harder et al. 2004). En effet, lors d'un travail sur l'effet d'un préconditionnement sur la cicatrisation de la cornée, Kim et al. ont montré que HSP70 est un facteur majeur dans la protection contre les lésions graves et semble également jouer un rôle important dans la guérison rapide des plaies. Les travaux consistent à appliquer un préconditionnement local par l'intermédiaire de gouttes oculaires de sérum physiologique chauffé ou refroidi. Ce préconditionnement est suivi d'une lésion secondaire représentée par une photoablation de la cornée. Parallèlement à l'analyse du niveau de cicatrisation des tissus oculaires, une étude immunohistochimique et en western blot vise à mettre en évidence le taux d'expression des HSP70 dans les différents groupes. Les résultats sont explicites et montrent une cicatrisation plus rapide et sans troubles secondaires dans les deux groupes préconditionnés par rapport au groupe contrôle. Le taux d'expression de HSP70 est significativement plus important dans ces deux groupes. Une variation de la température induit donc une production de HSP qui semble être un facteur essentiel dans la protection de la cornée face à une lésion secondaire. Ces résultats sont par ailleurs confirmés lors d'une seconde étude suivant le même protocole mais appliqué sur des souris Hsp 70.1 knockout. Sur ce modèle, aucun effet du préconditionnement n'est retrouvé, la cicatrisation de la cornée est retardée avec l'apparition de tissus cicatriciels opaques (Kim et al. 2004).

Notre étude montre que le préconditionnement Laser préserve principalement la structure des larges vaisseaux. Des études ont déjà montré la présence de HSP70 au niveau des cellules musculaires lisses artérielles dans les tissus mous (Berberian et coll. 1990; Johnson et coll. 1995). Un stress d'origine mécanique (Xu et coll. 2000), thermique (Slepian et coll. 1996) ou chimique (Lu et coll. 1993) induit une production de HSP 70 qui joue un rôle prévalent dans la réponse du réseau vasculaire (Luo et coll. 2007). L'induction de la production de cette protéine a déjà fait l'objet de travaux visant à modifier la réponse du tissu artériel nécrosé (Champagne et coll. 1999; Joyeux-Faure et coll. 2003), lésé par la présence de plaque d'athérosclérose (Berberian et al. 1990) ou ayant subi une angioplastie (George et coll. 2001).

Comme rappelé ci-dessus, l'effet délétère des Rayons X sur les gros vaisseaux s'exercerait principalement au niveau des cellules musculaires lisses. Or, la littérature décrit une production de HSP 70 principalement localisé au niveau de la média de la structure artérielle. Nos résultats montrent un marquage HSP70 positif au niveau du tissu osseux selon le même gradient que la distribution de la chaleur dans le tissu. Il semble alors possible de rapprocher le

taux d'expression de HSP70 à la protection tissulaire observé dans nos résultats. Ainsi la réponse au préconditionnement en milieu osseux suivrait le même schéma que celle décrite dans les tissus mous. Un travail complémentaire avec un modèle animal HSP 70.1 knockout comme étudié par Kim et al pourrait valider notre hypothèse.

#### **7.4. Perspectives cliniques potentielles**

La préservation des organes a été proposée par Perdrizet en 1989 (Perdrizet et coll. 1989). Face aux enjeux et aux perspectives de cette approche thérapeutique, la mise au point de modèles de préconditionnement a fait l'objet de nombreuses études jusqu'ici sur tissus mous (Cf. chap3, pour revue : (Perdrizet 1997; Latchman 1998). La mise en condition tissulaire d'un site osseux avant une pose d'implant a été proposée par Bert et coll dès 1989 sous le terme de stimulation endostée. Cette technique vise à revasculariser un os cortical avant la mise en place d'implants (Bert et coll. 1989). Dans cette technique, le site receveur est préparé lors d'une première intervention, par le passage d'une série de forets. Les résultats cliniques de cette technique signalent une néovascularisation avec apparition de nombreux sites d'ossification qui favorisent l'ostéointégration de l'implant posé secondairement. L'utilisation de la stimulation osseuse préalablement à la mise en place d'implants courts dans un os cortical permet de ramener le taux d'échec de 25 à 4,5% (Bert 1994). Les auteurs préconisent le protocole suivant :

Préparation du site osseux receveur -> 6 semaines d'attente -> mise en place de l'implant -> 4 à 5 mois d'attente -> mise en fonction.

Si les résultats sont encourageants, la lourdeur chirurgicale (2 interventions) et l'importance du délai (plus de 6 mois) avant la mise en fonction de l'implant soulignent les inconvénients de cette technique.

Notre travail s'intéresse à un concept différent. Ainsi Bert et al se proposent de majorer une vascularisation inexistante ou insuffisante au niveau receveur en créant une lésion primaire ayant pour but d'amener de nouveaux éléments vasculaires. Dans notre cas, le préconditionnement induit une protection du réseau vasculaire existant et ne nécessite pas d'intervention chirurgicale à proprement parler. Si le but recherché est le même, les mécanismes mis en jeu sont très différents et pourraient s'avérer complémentaires : protection du réseau vasculaire préexistant et/ou stimulation de l'angiogenèse. Ainsi, le préconditionnement laser avant la pose d'un implant permettrait une stimulation des capacités d'auto défense du réseau vasculaire présent. Cette technique aisée et rapide permettrait une

mise en condition tissulaire avant une intervention chirurgicale (représentant l'agression secondaire). En effet, cette approche innovante induit une configuration propice à l'un des critères fondamentaux de l'ostéointégration, à savoir le passage vers l'état cytoprotecteur du site osseux et de son lit vasculaire.

Cette application nécessite bien entendu une adaptation des paramètres du préconditionnement laser. Les implants courts mesurent en moyenne 7 à 8 mm de longueur pour un diamètre variant de 3,75 à 5 mm. Comme nous l'avons vu (Figure 9), la profondeur de pénétration du faisceau varie en fonction de la longueur d'onde du laser. Cependant, la mandibule est un os plat, d'ossification membraneuse et recouverte d'une fine couche de tissus mous au niveau des sites d'implantation. Ces caractéristiques sont donc voisines des caractéristiques de notre modèle d'étude, la longueur d'onde semble donc adaptée à une application clinique. De plus, la distribution de lumière liée au phénomène de diffusion optique, conduit à confiner l'élévation de température au sein de la calvaria (Figure 10). Cependant les caractéristiques anatomiques des maxillaires sont différentes de celles de la calvaria, en particulier d'un point de vue épaisseur. De plus la présence de tissus mous est également à prendre en considération.

L'augmentation du temps d'irradiation laser permet certes d'augmenter le volume chauffé mais ceci de manière limitée et inhomogène. De plus, un chauffage prolongé conduit à la diffusion de la chaleur par convection et non plus uniquement par conduction avec des conséquences tissulaires néfastes et étendues (cf. chap 4.1). Notre étude de distribution de la chaleur dans le tissu osseux (cf. chap 6.2.2) montre qu'il est possible d'appliquer un chauffage homogène sur un volume restreint. Cependant, il est très facile de chauffer le site osseux en plusieurs points afin de préconditionner la totalité du volume osseux. Cette application clinique peut également trouver son indication lors de la pose d'implant en milieu osseux défavorable, c'est à dire ayant subi par exemple une radiothérapie ou un traitement par bisphosphonates. Lors des cancers des voies aérodigestives supérieures, la réhabilitation prothétique des patients traités par la chirurgie et la radiothérapie est complexe. Les importantes pertes de substance liées à la chirurgie d'exérèse carcinologique font obstacle à la stabilisation et à la rétention de la prothèse. La pose d'ancrage osseux est alors indiquée mais le contexte n'en est pas pour autant favorable (Benateau et coll. 2001).

Si les risques d'ostéoradionécrose sont bien connus, ces dernières années ont vu apparaître des nécroses des maxillaires suite à des traitements par bisphosphonates essentiellement dans des indications de pathologies malignes. Des cas sont également décrits dans des indications bénignes telle que l'ostéoporose (Vieillard et coll. 2008). Les bisphosphonates agissent en ralentissant le remodelage osseux, principalement par inhibition de l'activité des ostéoclastes. Administrés par voie intraveineuse, les bisphosphonates sont indiqués dans la prise en charge des myélomes multiples, la prévention des complications

osseuses de certaines tumeurs malignes avancées, et le traitement des hypercalcémies malignes. Ils constituent par ailleurs le traitement le plus largement prescrit dans des maladies bénignes avec au premier rang le traitement de l'ostéoporose postménopausique chez les femmes à haut risque de fracture, le traitement de l'ostéoporose masculine, de l'ostéoporose corticoinduite.

La prise en charge de ces ostéonécroses est complexe, c'est pourquoi l'AFSSAPS a édité une série de recommandations, contre-indiquant dans certains cas (traitement sous biphosphonates en intra-veineux) la pose d'implants et minimisant au maximum le recours à la chirurgie (AFSSAPS 2007). Cependant, lorsque la situation clinique impose le recours à l'acte chirurgical, une mise en condition tissulaire pourrait également trouver ses indications. Une étude propose une amélioration de la prise en charge des ostéonécroses par traitement médicamenteux plus ou moins associé à un curetage chirurgical grâce à une stimulation laser. Cette étude sur 28 patients montre que l'application d'une irradiation laser 1064 nm Nd :YAG laser (puissance 1.25W, fréquence 15 Hz, irradiance 1555 W/cm<sup>2</sup>, fluence/min 167.94 J/cm<sup>2</sup> ) au niveau du séquestre osseux favorise la cicatrisation (Vescovi et coll. 2008). Ce traitement laser n'est pas utilisé dans un cadre de préconditionnement mais cependant les résultats obtenus semblent se baser sur son action thermique.

Notre travail reste actuellement très en amont de toutes applications cliniques possibles présentées ci-dessus. Des études complémentaires sont nécessaires avant une mise en œuvre éventuelle, cependant des applications cliniques potentielles existent.

## **7.5. Perspectives scientifiques**

Ces résultats posent la question du délai optimum entre le traitement préconditionnant et l'intervention secondaire. Notre étude montre des résultats significatifs à 24h. De plus, la revue de la littérature exposée (chap.3.3 ) montre que la production de HSP va croissante dès l'application du stress, atteint un pic de production entre 12 et 24h puis décroît dans les 96h suivantes. Cependant ces données sont observées sur des tissus mous.

Une étude complémentaire en western blot est en cours. Elle a pour but de quantifier la production de HSP à différents temps après l'application d'un stress thermique afin d'évaluer la courbe de production des HSP dans le tissu osseux. Cependant, cette technique exige le sacrifice des animaux, ce qui exclut la possibilité d'analyse longitudinale. En revanche, depuis quelques années, le gène responsable de la bioluminescence ou émission de lumière visible par des organismes vivants, a été identifié et utilisé pour marquer des protéines produites par la

cellule. Ainsi, le gène de la luciférase (noté luc) est utilisé en biologie moléculaire en tant que gène marqueur. Inséré à l'intérieur du gène de la protéine cible, si ce gène est activé, le gène marqueur luc est transcrit et traduit en même temps que le gène dans lequel il a été inséré. Puis, une réaction d'oxydation entre la luciférase ainsi synthétisée et le milieu contenant de la luciférine et de l'ATP, est responsable d'une émission lumineuse détectée par un capteur CCD hautement sensible à la longueur d'onde émise par la luciférase. Ces gènes marqueurs amènent ainsi à la mesure de la production de la protéine correspondante. Le suivi de la production de Hsp70 en utilisant ce gène luc rapporteur a été décrite par l'équipe de E. Duco Jansen (Wilmink et coll. 2006) comme l'illustre la Figure 57

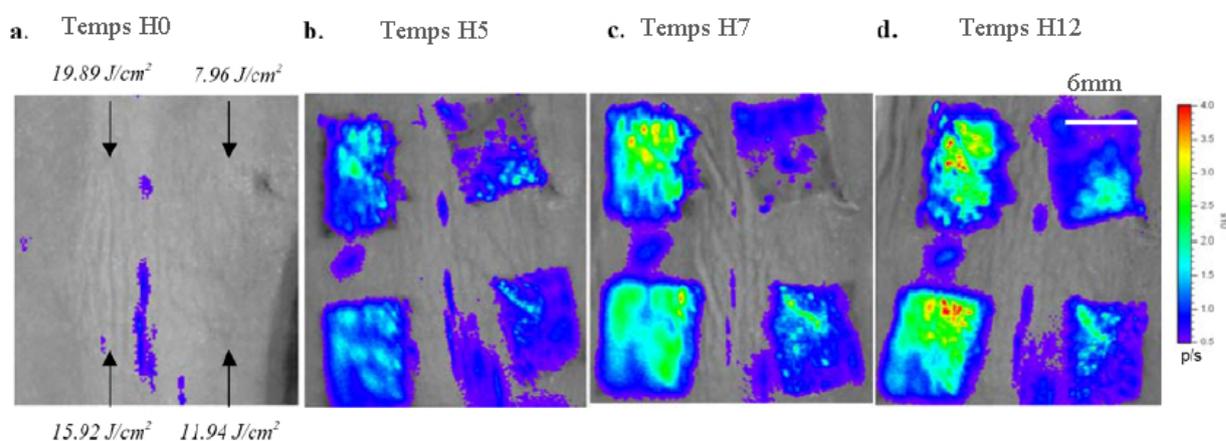


Figure 57: Visualisation par bioluminescence de la production de HSP70 suite à un tir laser d'après Wilmink

4 tirs laser sont réalisés sur le dos d'une souris marquée Hsp70-luc. (a) = présence de HSP avant le tir laser H0 (b) Temps H5 après le tir laser. (c) Temps H7. (d) Temps H12 après le tir laser. Une émission de lumière élevée apparaît de couleur rouge et une faible émission de lumière correspond à une couleur violette. Ainsi, il est possible de visualiser les variations spatiales et temporelles de l'expression de Hsp70 en bioluminescence. (Wilmink et al. 2006)

A nouveau, l'avenir de notre travail semble se tourner vers un modèle animal modifié génétiquement (HSP70  $-/-$  ou HSP70-luc). Les modifications génétiques sont conduites chez la souris. Ceci nécessiterait une adaptation de notre protocole de preconditionnement sur une souris, sachant que la calvaria d'une souris est très fine, d'un volume beaucoup restreint et de nature histologique différente que la calvaria du lapin (absence de système de Havers). Ces perspectives vont donc nécessiter la mise en place d'un nouveau protocole d'application du preconditionnement sachant que les outils actuels n'offrent pas la possibilité de travailler sur des lapins (HSP70  $-/-$  ou HSP70-luc).

La justification de nos résultats par l'unique présence des HSP est bien entendu une

vision restreinte du processus complexe de l'interaction entre laser et os. Il apparaît logique de penser que d'autres facteurs de croissance ou des cytokines au pouvoir angiogénique connu entrent en jeu. Ainsi, l'expression de facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) ou encore le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) impliqués dans le processus de cicatrisation osseuse sont d'autres pistes à étudier pour étayer les causes de l'effet vasculoprotecteur que nous avons observé dans ce travail. Il a, par exemple, été montré que le VEGF stimule le recrutement, la survie et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes (Street et coll. 2002). La première réaction cellulaire et tissulaire suite à un stress est l'activation de la cascade inflammatoire. Or, Wagstaff et al décrivent des complexes cytoplasmiques latents constitués de différents membres de la famille des HSP dont HSP70, des immunophilines et des récepteurs aux glucocorticoïdes (cf. Figure 3) (Wagstaff et al. 2007). Ce complexe contribue au maintien du récepteur dans un état inactif mais compétent pour son activation par le ligand et ses effets subséquents sur la régulation de l'expression génétique. Cette configuration est requise pour la liaison optimale de haute affinité de l'hormone (Polla 1998). Lors d'un stress, ce complexe est activé et chaque élément est activé, HSP70 est donc libérée pour jouer son rôle de molécule chaperonne (cf. Figure 4) et la voie de l'inflammation est activé par la liaison récepteur/Hormone stéroïde. Parallèlement, il a été montré que les glucocorticoïdes ont une action sur le taux d'expression du TGF $\beta$  dans les tissus cutanés (Frank et coll. 1996). Synthétisé par les ostéoblastes, le TGF $\beta$  est présent dans le tissu osseux. Ses effets sur ce dernier sont complexes et largement dépendants de la mise en jeu d'autres facteurs. Cependant, son rôle dans la différenciation et la prolifération des cellules précurseurs en ostéoblastes ainsi que dans la synthèse du collagène par ces derniers est couramment décrit (Miossec 1998).

Un lien entre tous ces facteurs semble envisageable grâce à l'étude de la littérature. Des investigations pourraient être entreprises afin de déterminer le rôle des HSP70 dans les mécanismes moléculaires contrôlant la cicatrisation osseuse.

## **8. CONCLUSION**

Le préconditionnement thermique par laser est efficace pour réduire la chute du taux de vascularisation osseuse induite par une irradiation aux rayons X et favorise ainsi la guérison du tissu. Ainsi, l'effet cytoprotecteur du préconditionnement déjà démontré sur les tissus mous, existe également au niveau des tissus calcifiés. Ce mécanisme de pré traitement représente une nouvelle approche dans l'amélioration de la cicatrisation osseuse mettant en avant l'utilisation des capacités d'auto protection du réseau vasculaire osseux. L'analyse immunohistochimique confirme qu'un préconditionnement Laser induit la production de HSP70 au niveau osseux qui pourrait être à l'origine de l'effet protecteur observé *in vivo* et de la résistance accrue aux dommages induits par l'irradiation aux rayons X. Cette technique pourrait permettre une mise en condition tissulaire avant une intervention chirurgicale (représentant l'agression secondaire). En effet, cette approche innovante induit le passage vers l'état cytoprotecteur du site osseux et de son lit vasculaire. Ce travail offre également d'autres perspectives scientifiques. Des applications du préconditionnement laser sur des animaux transgéniques permettraient d'étayer nos hypothèses. L'étude de l'impact d'un préconditionnement laser dans le contexte plus général de l'inflammation et de l'expression des facteurs qui lui sont associés offre également un intérêt majeur dans la compréhension du processus de la cicatrisation osseuse.

## **9. TABLE DES FIGURES :**

Figure 1 : Coupe de tissu osseux vue en polarisation : Organisation en système de Havers. ...	28
Figure 2: Organisation de la vascularisation osseuse <i>adapté</i> d'après McCarthy.....	29
Figure 3: Fonctions des HSP constitutives dans la cellule d'après Wagstaff.....	35
Figure 4: Expression et fonctions des HSP sous un stress d'après Wagstaff.....	36
Figure 5 : Courbe d'expression des HSP en fonction du degré et de la durée du chauffage. ...	46
Figure 6: Chambre optique et son site d'implantation .....	50
Figure 7: Système diode laser.....	53
Figure 8: Schéma des 3 étapes de l'action thermique du tir laser .....	54
Figure 9: Spectre d'absorption des principaux chromophores des tissus calcifiés adapté d'après Pokora (Pokora, 2007).....	55
Figure 10: Diffusion du faisceau laser au sein du tissu osseux adaptée d'après les travaux de Reinisch qui présentent la diffusion thermique dans le tissu cutané. (Reinisch 2002) .....	57
Figure 11: Distribution d'un rayonnement haute énergie sur un patient.....	63
Figure 12: Distribution du rayonnement X à faible énergie dans les tissus.....	64
Figure 13: Marquage anti-CD31.....	68
Figure 14: Autofluorescence du tissu osseux.....	69
Figure 15 Immunomarquage HSP47 sur tissu osseux.....	70
Figure 16: Chambre optique.....	73
Figure 17: Scanner de la chambre optique implantée sur calvaria .....	74
Figure 18: Chambre optique implantée (A) et dispositif de repositionnement (B).....	75
Figure 19: Exemple de spectre Raman, acquisition effectuée à une longueur d'onde excitatrice $\lambda = 632\text{nm}$ .....	76
Figure 20: Réalisation des photographies.....	79
Figure 21: Image modifiée avec Adobe Photoshop 8.0 <sup>®</sup> .....	80
Figure 22: Mesure de la densité vasculaire à l'aide de logiciel Builder Imaq Vision <sup>®</sup> . .....	80
Figure 23: Analyse de l'image par Aphelion <sup>™</sup> .....	82
Figure 24: Système diode-laser 815 nm .....	85
Figure 25: Pièce à main mise au point pour la stimulation laser .....	86
Figure 26: Protocole de mesure de température sur os sec .....	88
Figure 27: Montage pour les mesures de température induites par le tir laser sur os sec.....	89
Figure 28: Application du préconditionnement laser .....	91
Figure 29: Protocole de l'étude <i>in vivo</i> .....	92
Figure 30: Exemple de cicatrisation du site osseux après la pose de la chambre optique .....	96

Figure 31 : Evolution du réseau vasculaire du groupe contrôle#1 .....	97
Figure 32 : Caractérisation Raman de l'interface chambre / Os.....	99
Figure 33 : Coupe histologique de la chambre et de son support osseux inclus en résine. ....	100
Figure 34: Interface Chambre Optique / Calvaria analysée par microscopie Raman en mode imagerie, taille zone analysée 5×35 µm.....	101
Figure 35: Evolution de la température osseuse à 0.7 mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : mesures expérimentales .....	102
Figure 36 : Evolution de la température osseuse à 1.5mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : mesures expérimentales. ....	103
Figure 37: Evolution de la température osseuse à 0.7 mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : Modélisation mathématique .....	104
Figure 38: Evolution de la température osseuse à 1.5 mm de profondeur selon différentes puissances de tir laser : Modélisation mathématique. ....	105
Figure 39: Modélisation mathématique de la distribution de la chaleur dans l'espace pour un tir de 3,3W.....	106
Figure 40 : Contrôle histologique du tissu osseux après tir laser.....	107
Figure 41: Evolution de la densité vasculaire selon les différents stimuli appliqués sur l'os ....	108
Figure 42: Evolution du réseau vasculaire d'un lapin du groupe laser (#2).....	109
Figure 43: Evolution du réseau vasculaire d'un lapin du groupe rayons X (#3).....	109
Figure 44: Evolution du réseau vasculaire d'un lapin du groupe laser avant rayons X (#4).....	110
Figure 45: Evolution du nombre de noeuds .....	111
Figure 46: Evolution de la longueur du réseau vasculaire .....	112
Figure 47: Evolution du nombre de vaisseaux en fonction de leur diamètre.....	113
Figure 48: Coupe histologique Groupe #1 (contrôle) .....	115
Figure 49: Coupe histologique Groupe#2 (laser) .....	116
Figure 50: Coupe histologique Groupe#3 (rayons X).....	118
Figure 51: Coupe histologique Groupe #4 (laser avant rayons X) .....	120
Figure 52: immunomarquage HSP70 d'une coupe de tissu osseux 18h après tir laser.....	121
Figure 53: Immunomarquage HSP70 sur tissu osseux.....	122
Figure 54: Emergence de vaisseaux sanguins (flèche) observée sur différentes zones d'une image numérique échelle*2.....	125
Figure 55: Evolution de la température osseuse selon la puissance du tir laser: Modélisation mathématique et mesures.....	131
Figure 56: Comparaison de l'évolution du réseau vasculaire de lapin des groupes #3 et #4 ..	134
Figure 57: Visualisation par bioluminescence de la production de HSP70 suite à un tir laser d'après Wilmink.....	139

## 10. TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Revue de Littérature: Stress thermique préconditionnant et production de HSP .....	39
Tableau 2: Revue de littérature: Hyperthermie et dommage osseux irréversible .....	45
Tableau 3: Echantillons inclus en paraffine avant d'être décalcifiés .....	66
Tableau 4: Echantillons décalcifiés avant d'être inclus en paraffine .....	67
Tableau 5: Immunoréactivité du tissu osseux selon différents protocoles de décalcification.....	67
Tableau 6: Evolution du réseau vasculaire osseux entre S0 et S8 .....	114

## **11. BIBLIOGRAPHIE:**

1. AFSSAPS (2007) "Recommandations sur la prise en charge bucco-dentaire des patients traités par bisphosphonates." lettre aux professionnels de santé: [www.afssaps.sante.fr](http://www.afssaps.sante.fr)
2. Albrektsson, T., Wennerberg, A. (2005). ""The impact of oral implants; Past and Future, 1966-2042."" J Can Dent Assoc **71**(5).
3. Arnold, M., P. Stas, J. Kummermehr, S. Schultz-Hector et K. R. Trott (1998). "Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation." Radiother Oncol **48**(3): 259-65.
4. Ballara, S. C., J. M. Miotla et E. M. Paleolog (1999). "New vessels, new approaches: angiogenesis as a therapeutic target in musculoskeletal disorders." Int J Exp Pathol **80**(5): 235-50.
5. Bashkatov, A. N., Genina, Elina A., Kochubey, , Tuchin Valery V. (2006). "Optical properties of human cranial bone in the spectral range from 800 to 2000 nm." SPIE **6163**: 616310-21.
6. Becker, J. et E. A. Craig (1994). "Heat-shock proteins as molecular chaperones." Eur J Biochem **219**(1-2): 11-23.
7. Beckham, J. T., M. A. Mackanos, C. Crooke, T. Takahashi, C. O'Connell-Rodwell, C. H. Contag et E. D. Jansen (2004). "Assessment of cellular response to thermal laser injury through bioluminescence imaging of heat shock protein 70." Photochem Photobiol **79**(1): 76-85.
8. Benateau, H., F. Crasson, D. Labbe, S. Riscala et T. Alix (2001). "[Extra-oral implants and irradiation: current trends]." Rev Stomatol Chir Maxillofac **102**(5): 266-9.
9. Berberian, P. A., W. Myers, M. Tytell, V. Challa et M. G. Bond (1990). "Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries." Am J Pathol **136**(1): 71-80.
10. Bert, M. (1994). Complications et échecs en implantologie. Paris, C.d.P.
11. Bert, M. (2006). "La stimulation endostée." Alternatives **32**: 37-40.
12. Bert, M., J. Itic et R. Serfaty (1989). "[Endosteal stimulation in implantology. Study and results after 2 years]." Cah Prothese(65): 22-31.
13. Bert, M., Missika, P., Giovannoli JL. (2004). Gestion des complications implantaires paris, Quintessence International.
14. Blacher, S., Devy, L., Hlushchuk, R., Larger, E., Lamandé, N., Burri, P., Corvol, P., Djonov, V., Foidart, JM., Noël, A. (2005). "Quantification of angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). ." Image Anal Stereol **24**: 169-180.

15. Branemark, P., Zarb, G.A., Albrektsson, T. (1985). Bone Tissue Response: 129-143.
16. Brogniez, V., P. Lejuste, A. Pecheur et H. Reyhler (1998). "Dental prosthetic reconstruction of osseointegrated implants placed in irradiated bone." Int J Oral Maxillofac Implants **13**(4): 506-12.
17. Capon, A. et S. Mordon (2003). "Can thermal lasers promote skin wound healing?" Am J Clin Dermatol **4**(1): 1-12.
18. Carano, R. A. et E. H. Filvaroff (2003). "Angiogenesis and bone repair." Drug Discov Today **8**(21): 980-9.
19. Champagne, M. J., P. Dumas, S. N. Orlov, M. R. Bennett, P. Hamet et J. Tremblay (1999). "Protection against necrosis but not apoptosis by heat-stress proteins in vascular smooth muscle cells: evidence for distinct modes of cell death." Hypertension **33**(3): 906-13.
20. Chanavaz, M. (1995). "[The periosteum: the "umbilical cord" of bone. Quantification of the blood supply of cortical bone of periosteal origin]." Rev Stomatol Chir Maxillofac **96**(4): 262-7.
21. Chen, H et S. Saha (1987). "Thermal analysis of the bone surface induced by laser radiation." Ann Biomed Eng **15**(5): 457-66.
22. Choi, J. Y., B. S. Tanenbaum, T. E. Milner, X. V. Dao, J. S. Nelson, E. N. Sobol et B. J. Wong (2001). "Thermal, mechanical, optical, and morphologic changes in bovine nucleus pulposus induced by Nd:YAG ( $\lambda = 1.32$  microm) laser irradiation." Lasers Surg Med **28**(3): 248-54.
23. Contaldo, C., Y. Harder, J. Plock, A. Banic, S. M. Jakob et D. Erni (2007). "The influence of local and systemic preconditioning on oxygenation, metabolism and survival in critically ischaemic skin flaps in pigs." J Plast Reconstr Aesthet Surg.
24. Craig, E. A. (1985). "The heat shock response." CRC Crit Rev Biochem **18**(3): 239-80.
25. De Vernejoul, M., Marie, P. (1996). Remodelage osseux et cellules osseuses. Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. Paris, Flammarion Medecine Sciences.
26. Desmettre, T., C. A. Maurage et S. Mordon (2003). "Transpupillary thermotherapy (TTT) with short duration laser exposures induce heat shock protein (HSP) hyperexpression on choroidretinal layers." Lasers Surg Med **33**(2): 102-7.
27. Dewhirst, M. W., B. L. Viglianti, M. Lora-Michiels, M. Hanson et P. J. Hoopes (2003). "Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia." Int J Hyperthermia **19**(3): 267-94.
28. Dimitrievich, G. S., K. Fischer-Dzoga et M. L. Griem (1984). "Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative in vivo study." Radiat Res **99**(3): 511-35.

29. Dische, S. (2001). Efficacité de l'oxygénothérapie hyperbare dans le traitement des lésions des tissus sains induites par les radiations ionisantes. 5ème conférence de consensus européenne sur la Médecine hyperbare. Lisbonne, Portugal.
30. Duchêne, A., Jousset-Dubien, J. (2001). Les effets biologiques des rayonnements non ionisants. Paris, Flammarion.
31. Engsig, M. T., Q. J. Chen, T. H. Vu, A. C. Pedersen, B. Therkidsen, L. R. Lund, K. Henriksen, T. Lenhard, N. T. Foged, Z. Werb et J. M. Delaisse (2000). "Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones." J Cell Biol **151**(4): 879-89.
32. Eriksson, A. R. et T. Albrektsson (1983). "Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit." J Prosthet Dent **50**(1): 101-7.
33. Firbank, M., M. Hiraoka, M. Essenpreis et D. T. Delpy (1993). "Measurement of the optical properties of the skull in the wavelength range 650-950 nm." Phys Med Biol **38**(4): 503-10.
34. Fischer-Dzoga, K., G. S. Dimitrievich et M. L. Griem (1984). "Radiosensitivity of vascular tissue. II. Differential radiosensitivity of aortic cells in vitro." Radiat Res **99**(3): 536-46.
35. Frank, S., M. Madlener et S. Werner (1996). "Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing." J Biol Chem **271**(17): 10188-93.
36. Frost, H. (1964). Dynamics of bone remodelling. Bone Dynamics Little. Boston, Brown and Co: 315-333.
37. Gaspard, M. (1978). Première partie. L'appareil manducateur et la manducation. Paris, Julien Prélat.
38. George, J., S. Greenberg, I. Barshack, M. Singh, S. Pri-Chen, S. Laniado et G. Keren (2001). "Accelerated intimal thickening in carotid arteries of balloon-injured rats after immunization against heat shock protein 70." J Am Coll Cardiol **38**(5): 1564-9.
39. Gerber, H. P., T. H. Vu, A. M. Ryan, J. Kowalski, Z. Werb et N. Ferrara (1999). "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation." Nat Med **5**(6): 623-8.
40. Glowacki, J. (1998). "Angiogenesis in fracture repair." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): 82-9.
41. Granstrom, G., A. Tjellstrom et P. I. Branemark (1999). "Osseointegrated implants in irradiated bone: a case-controlled study using adjunctive hyperbaric oxygen therapy." J Oral Maxillofac Surg **57**(5): 493-9.
42. Hammerer-Lercher, A., C. Haeusler, M. Prelog, J. Bonatti, D. Hoefler, E. Ruttmann, G. Laufer, E. R. Werner, S. Dirnhofer, B. Puschendorf et J. Mair (2006). "Thermal

- preconditioning protects the human internal mammary artery from hypoxia/re-oxygenation-induced damage." Clin Exp Pharmacol Physiol **33**(7): 584-90.
43. Hansen-Algenstaedt, N., C. Joscheck, L. Wolfram, C. Schaefer, I. Muller, A. Bottcher, G. Deuretzbacher, L. Wiesner, M. Leunig, P. Algenstaedt et W. Ruther (2006). "Sequential changes in vessel formation and micro-vascular function during bone repair." Acta Orthop **77**(3): 429-39.
  44. Hansen-Algenstaedt, N., C. Schaefer, L. Wolfram, C. Joscheck, M. Schroeder, P. Algenstaedt et W. Ruther (2005). "Femur window--a new approach to microcirculation of living bone in situ." J Orthop Res **23**(5): 1073-82.
  45. Harder, Y., M. Amon, R. Schramm, M. Georgi, A. Banic, D. Erni et M. D. Menger (2005). "Heat shock preconditioning reduces ischemic tissue necrosis by heat shock protein (HSP)-32-mediated improvement of the microcirculation rather than induction of ischemic tolerance." Ann Surg **242**(6): 869-78, discussion 878-9.
  46. Harder, Y., C. Contaldo, J. Klenk, A. Banic, S. M. Jakob et D. Erni (2004). "Improved skin flap survival after local heat preconditioning in pigs." J Surg Res **119**(1): 100-5.
  47. Hightower, L. E. (1991). "Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity." Cell **66**(2): 191-7.
  48. Hirakawa, Y., T. Kuga, Y. Ohara, H. Hata, H. Tomoike et A. Takeshita (1995). "Mechanisms of coronary hyperconstriction in response to serotonin induced by X-irradiation in miniature pigs: increased constrictive response of medial smooth muscle." Heart Vessels **10**(4): 190-6.
  49. Hopewell, J. W. et C. M. Young (1978). "Changes in the microcirculation of normal tissues after irradiation." Int J Radiat Oncol Biol Phys **4**(1-2): 53-8.
  50. Houpt, J. C., E. S. Conner et E. W. McFarland (1996). "Experimental study of temperature distributions and thermal transport during radiofrequency current therapy of the intervertebral disc." Spine **21**(15): 1808-12; discussion 1812-3.
  51. International Atomic Energy Agency (2005). Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students. Vienna, E.B Podgorsak sponsored by IAEA.
  52. Ito, H., T. Shimojo, H. Fujisaki, M. Tamamori, S. Ishiyama, S. Adachi, S. Abe, F. Marumo et M. Hiroe (1999). "Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cells from doxorubicin-induced apoptosis." Life Sci **64**(9): 755-61.
  53. Johnson, A. D., P. A. Berberian, M. Tytell et M. G. Bond (1995). "Differential distribution of 70-kD heat shock protein in atherosclerosis. Its potential role in arterial SMC survival." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(1): 27-36.
  54. Joyeux-Faure, M., C. Arnaud, D. Godin-Ribuot et C. Ribaut (2003). "Heat stress preconditioning and delayed myocardial protection: what is new?" Cardiovasc Res **60**(3): 469-77.

55. Kelty, J. D., P. A. Noseworthy, M. E. Feder, R. M. Robertson et J. M. Ramirez (2002). "Thermal preconditioning and heat-shock protein 72 preserve synaptic transmission during thermal stress." J Neurosci **22**(1): 193- 9.
56. Kim, J. M., J. C. Kim, W. C. Park, J. S. Seo et H. R. Chang (2004). "Effect of thermal preconditioning before excimer laser photoablation." J Korean Med Sci **19**(3): 437-46.
57. King, M. A., G. W. Casarett et D. A. Weber (1979). "A study of irradiated bone: I. histopathologic and physiologic changes." J Nucl Med **20**(11): 1142-9.
58. Koenig, W. J., R. A. Lohner, G. A. Perdrizet, M. E. Lohner, R. T. Schweitzer et V. L. Lewis, Jr. (1992). "Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery." Plast Reconstr Surg **90**(4): 659-64.
59. Krause, L. S., C. M. Cobb, J. W. Rapley, W. J. Killoy et P. Spencer (1997). "Laser irradiation of bone. I. An in vitro study concerning the effects of the CO2 laser on oral mucosa and subjacent bone." J Periodontol **68**(9): 872-80.
60. Lakshmi, R. J., M. Alexander, J. Kurien, K. K. Mahato et V. B. Kartha (2003). "Osteoradionecrosis (ORN) of the mandible: a laser Raman spectroscopic study." Appl Spectrosc **57**(9): 1100-16.
61. Latchman, D. S. (1998). "Heat shock proteins: protective effect and potential therapeutic use (review)." Int J Mol Med **2**(4): 375-81.
62. Latchman, D. S. (2004). "Protective effect of heat shock proteins in the nervous system." Curr Neurovasc Res **1**(1): 21-7.
63. Law, M. P. (1981). "The induction of thermal resistance in the ear of the mouse by heating at temperatures ranging from 41.5 to 45.5 degrees C." Radiat Res **85**(1): 126-34.
64. Lesclous, P., D. Guez, B. Baroukh, A. Vignery et J. L. Saffar (2004). "Histamine participates in the early phase of trabecular bone loss in ovariectomized rats." Bone **34**(1): 91-9.
65. Leucht, P., K. Lam, J. B. Kim, M. A. Mackanos, D. M. Simanovskii, M. T. Longaker, C. H. Contag, H. A. Schwettman et J. A. Helms (2007). "Accelerated bone repair after plasma laser corticotomies." Ann Surg **246**(1): 140-50.
66. Leunig, M., F. Yuan, D. A. Berk, L. E. Gerweck et R. K. Jain (1994). "Angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vivo assay in nude mice." Lab Invest **71**(2): 300-7.
67. Liebergall, M., C. H. Abu-Sneineh, S. Eylon, S. Mendelson, D. Segal et A. Simkin (2000). "Effect of microwave oven induced mild hyperthermia on bone viability and strength." Clin Orthop Relat Res(372): 272-9.

68. Loones, M. T. et M. Morange (1998). "Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo." Cell Stress Chaperones **3**(4): 237-44.
69. Lopes, C. B., A. L. Pinheiro, S. Sathaiah, J. Duarte et M. Cristinamartins (2005). "Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study." Photomed Laser Surg **23**(1): 27-31.
70. Lu, B. Y., R. S. Yang, W. L. Lin, K. S. Cheng, C. Y. Wang et T. S. Kuo (2000). "Theoretical study of convergent ultrasound hyperthermia for treating bone tumors." Med Eng Phys **22**(4): 253-63.
71. Lu, D., N. Maulik, Moraru, II, D. L. Kreutzer et D. K. Das (1993). "Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress." Am J Physiol **264**(3 Pt 1): C715-22.
72. Luo, S. S., K. Sugimoto, S. Fujii, T. Takemasa, S. B. Fu et K. Yamashita (2007). "Role of heat shock protein 70 in induction of stress fiber formation in rat arterial endothelial cells in response to stretch stress." Acta Histochem Cytochem **40**(1): 9-17.
73. Marcelli, C., Sébert, JL. (1993). Architecture et résistance mécanique osseuses. Paris, Masson.
74. Martin, C., Riou, B., Vallet, B. (2006). Physiologie Humaine Appliquée. Rueil Malmaison, Arnette.
75. Marx, R. E. (1983). "Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology." J Oral Maxillofac Surg **41**(5): 283-8.
76. Marx, R. E. et R. P. Johnson (1987). "Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **64**(4): 379-90.
77. McCarthy, I. (2006). "The physiology of bone blood flow: a review." J Bone Joint Surg Am **88 Suppl 3**: 4-9.
78. Mendes, R. L., C. M. Nutting et K. J. Harrington (2002). "Managing side effects of radiotherapy in head and neck cancer." Hosp Med **63**(12): 712-7.
79. Miossec, P., Guerne, PA. (1998). Le TGF beta. L'inflammation. J. L. EUROTEXT: 421-429.
80. Mordon, S. (1995). Actions thermiques des lasers. Padoue, Italie, SFLM.
81. Mordon, S., Zanca, M., Berdugo, M., Marchandise, X. (2007). Les effets des agents physiques autres que ionisants. Biophysique pour les sciences e la vie et de la santé. omniscience. Sophia-Antipolis.
82. Mordon, S. R., B. Wassmer et J. Zemmouri (2006). "Mathematical modeling of endovenous laser treatment (ELT)." Biomed Eng Online **5**: 26.
83. Muhonen, A., M. Haaparanta, T. Gronroos, J. Bergman, J. Knuuti, S. Hinkka et R. P. Happonen (2004). "Osteoblastic activity and neoangiogenesis in distracted bone of

- irradiated rabbit mandible with or without hyperbaric oxygen treatment." Int J Oral Maxillofac Surg **33**(2): 173-8.
84. Nagata, K. (1996). "Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone." Trends Biochem Sci **21**(1): 22-6.
  85. Neschis, D. G., S. D. Safford, P. N. Raghunath, D. J. Langer, M. L. David, A. K. Hanna, J. E. Tomaszewski, K. Kariko, E. S. Barnathan et M. A. Golden (1998). "Thermal preconditioning before rat arterial balloon injury: limitation of injury and sustained reduction of intimal thickening." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(1): 120-6.
  86. Ninomiya, T., Y. Miyamoto, T. Ito, A. Yamashita, M. Wakita et T. Nishisaka (2003). "High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur." J Bone Miner Metab **21**(2): 67-73.
  87. Nollen, E. A., J. F. Brunsting, H. Roelofsen, L. A. Weber et H. H. Kampinga (1999). "In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance." Mol Cell Biol **19**(3): 2069-79.
  88. O'Connell-Rodwell, C., Mackanos, M., Simanovskii, D., Cao, Y., Bachmann, M., Schwettman, H., Contag, C. (2008). "In vivo analysis of heat-shock-protein-70 induction following pulsed laser irradiation in a transgenic reporter mouse." JBO letters **13**(3): 1-3.
  89. O'Connell-Rodwell, C. E., D. Shriver, D. M. Simanovskii, C. McClure, Y. A. Cao, W. Zhang, M. H. Bachmann, J. T. Beckham, E. D. Jansen, D. Palanker, H. A. Schwettman et C. H. Contag (2004). "A genetic reporter of thermal stress defines physiologic zones over a defined temperature range." Faseb J **18**(2): 264-71.
  90. O'Connor, M. M. et M. R. Mayberg (2000). "Effects of radiation on cerebral vasculature: a review." Neurosurgery **46**(1): 138-49; discussion 150-1.
  91. Ohtsubo, S., M. Matsuda et M. Takekawa (2003). "Angiogenesis after sintered bone implantation in rat parietal bone." Histol Histopathol **18**(1): 153-63.
  92. Okunieff, P., X. Wang, P. Rubin, J. N. Finkelstein, L. S. Conline et I. Ding (1998). "Radiation-induced changes in bone perfusion and angiogenesis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **42**(4): 885-9.
  93. Penel, G., C. Delfosse, M. Descamps et G. Leroy (2005). "Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy." Bone **36**(5): 893-901.
  94. Penel, G., G. Leroy, C. Rey et E. Bres (1998). "MicroRaman spectral study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> vibrational modes in synthetic and biological apatites." Calcif Tissue Int **63**(6): 475-81.
  95. Perdrizet, G. A. (1997). Heat shock response and organ preservation: models of stress conditioning. Texas, United States, R.G. Landes Company.

96. Perdrizet, G. A., T. G. Heffron, F. C. Buckingham, P. J. Salciunas, A. O. Gaber, F. P. Stuart et J. R. Thistlethwaite (1989). "Stress conditioning: a novel approach to organ preservation." Curr Surg **46**(1): 23-6.
97. Pespeni, M., M. Hodnett et J. F. Pittet (2005). "In vivo stress preconditioning." Methods **35**(2): 158-64.
98. Plumier, J. C., B. M. Ross, R. W. Currie, C. E. Angelidis, H. Kazlaris, G. Kollias et G. N. Pagoulatos (1995). "Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery." J Clin Invest **95**(4): 1854-60.
99. Polla, B., Meng, X., Catelli, MG. (1998). Protéines de stress et inflammation. L'inflammation. J. L. EUROTEXT: 480-491.
100. Pourzarandian, A., H. Watanabe, A. Aoki, S. Ichinose, K. M. Sasaki, H. Nitta et I. Ishikawa (2004). "Histological and TEM examination of early stages of bone healing after Er:YAG laser irradiation." Photomed Laser Surg **22**(4): 342-50.
101. Probst, A. et H. U. Spiegel (1997). "Cellular mechanisms of bone repair." J Invest Surg **10**(3): 77-86.
102. Ramser, K., K. Logg, M. Goksor, J. Enger, M. Kall et D. Hanstorp (2004). "Resonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes." J Biomed Opt **9**(3): 593-600.
103. Reinisch, L. (2002). "Scatter-limited phototherapy: a model for laser treatment of skin." Lasers Surg Med **30**(5): 381-8.
104. Rodríguez, G. P., Arenas, A.C., Muñoz Hernández, R.A., Stolik, S., Orea, A.C., Sinencio, F.S. (2001). "Measurement of Thermal Diffusivity of Bone, Hydroxyapatite and Metals for Biomedical Application." Analytical Sciences **17**: 357-360.
105. Roux, F., Devaux, B. (1999). Diode Lasers in Neurosurgery. Paris Editions John Libbey Eurotext.
106. Rucker, M., B. Kadirogullari, B. Vollmar, W. J. Spitzer et M. D. Menger (2005). "Improvement of nutritive perfusion after free tissue transfer by local heat shock-priming-induced preservation of capillary flowmotion." J Surg Res **123**(1): 102-8.
107. Rucker, M., T. Schafer, F. Roesken, W. J. Spitzer, M. Bauer et M. D. Menger (2001). "Local heat-shock priming-induced improvement in microvascular perfusion in osteomyocutaneous flaps is mediated by heat-shock protein 32." Br J Surg **88**(3): 450-7.
108. Skinner, M. G., M. N. Iizuka, M. C. Kolios et M. D. Sherar (1998). "A theoretical comparison of energy sources--microwave, ultrasound and laser--for interstitial thermal therapy." Phys Med Biol **43**(12): 3535-47.
109. Slepian, M. J., S. P. Massia et L. Whitesell (1996). "Pre-conditioning of smooth muscle cells via induction of the heat shock response limits proliferation following mechanical injury." Biochem Biophys Res Commun **225**(2): 600-7.

110. Souil, E., A. Capon, S. Mordon, A. T. Dinh-Xuan, B. S. Polla et M. Bachelet (2001). "Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin." Br J Dermatol **144**(2): 260-6.
111. Street, J., M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, Jr., N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H. P. Redmond, R. A. Carano et E. H. Filvaroff (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9656-61.
112. Svaasand, L. O., T. Boerslid et M. Oeveraasen (1985). "Thermal and optical properties of living tissue: application to laser-induced hyperthermia." Lasers Surg Med **5**(6): 589-602.
113. Tang, X. M. et B. P. Chai (1986). "Effect of CO<sub>2</sub> laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study." Lasers Surg Med **6**(3): 346-52.
114. Thompson, H. J., J. N. McGinley, K. K. Knott, N. S. Spoelstra et P. Wolfe (2002). "Vascular density profile of rat mammary carcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea: implications for the investigation of angiogenesis." Carcinogenesis **23**(5): 847-54.
115. Tiffée, J. C., J. P. Griffin et L. F. Cooper (2000). "Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia." Tissue Cell **32**(2): 141-7.
116. Tissières, A., H. K. Mitchell et U. M. Tracy (1974). "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs." J Mol Biol **85**(3): 389-98.
117. Topping, A., D. Gault, A. Grobbelaar, C. Green, R. Sanders, P. Sibbons et C. Linge (2001). "Successful reduction in skin damage resulting from exposure to the normal-mode ruby laser in an animal model." Br J Plast Surg **54**(2): 144-50.
118. Ugryumova, N., S. J. Matcher et D. P. Attenburrow (2004). "Measurement of bone mineral density via light scattering." Phys Med Biol **49**(3): 469-83.
119. Verrico, A. K., A. K. Haylett et J. V. Moore (2001). "In vivo expression of the collagen-related heat shock protein HSP47, following hyperthermia or photodynamic therapy." Lasers Med Sci **16**(3): 192-8.
120. Vescovi, P., E. Merigo, M. Manfredi, M. Meleti, C. Fornaini, M. Bonanini, J. P. Rocca et S. Nammour (2008). "Nd:YAG laser biostimulation in the treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: clinical experience in 28 cases." Photomed Laser Surg **26**(1): 37-46.
121. Vieillard, M. H., J. M. Maes, G. Penel, T. Facon, L. Magro, J. Bonneterre et B. Cortet (2008). "Thirteen cases of jaw osteonecrosis in patients on bisphosphonate therapy." Joint Bone Spine **75**(1): 34-40.
122. Wagstaff, M. J., M. Shah, D. A. McGrouther et D. S. Latchman (2007). "The heat shock proteins and plastic surgery." J Plast Reconstr Aesthet Surg **60**(9): 974-82.

123. Wallace, A. L., R. Makki, J. B. Weiss et S. P. Hughes (1995). "Measurement of serum angiogenic factor in devascularized experimental tibial fractures." J Orthop Trauma **9**(4): 324-32.
124. Wallace, A. L., B. McLaughlin, J. B. Weiss et S. P. Hughes (1991). "Increased endothelial cell stimulating angiogenesis factor in patients with tibial fractures." Injury **22**(5): 375-6.
125. Wilmink, G. J., S. R. Opalenik, J. T. Beckham, J. M. Davidson et E. D. Jansen (2006). "Assessing laser-tissue damage with bioluminescent imaging." J Biomed Opt **11**(4): 041114.
126. Winet, H. (1996). "The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy." Bone **19**(1 Suppl): 39S-57S.
127. Winet, H., J. Y. Bao et R. Moffat (1990). "A control model for tibial cortex neovascularization in the bone chamber." J Bone Miner Res **5**(1): 19-30.
128. Winet, H., J. Y. Bao et R. Moffat (1990). "Neo-osteogenesis of haversian trabeculae through a bone chamber implanted in a rabbit tibial cortex: a control model." Calcif Tissue Int **47**(1): 24-34.
129. Wirth, D., Gustin, P., Drion, P.V., Dessy-doize, C., Chrisians, E.S. (2002). "Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). I : Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques." Ann. Méd. Vét. **146**: 201-216.
130. Wolf, E., Roser, K., Hahn, M., Welkerling, H., Delling, G. (1992). "Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. **420**(1): 17-24.
131. Wood, B., Caspers, P., Puppels, G.J., Pandiancherri, S., McNaughton, D. (2007). "Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation." Anal Bioanal Chem **387**: 1691-1703.
132. Xie, X., W. Qiu et W. Yuan (1998). "[Experimental study of radiation effects on the mandibular microvasculature of the guinea-pigs]." Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi **16**(1): 5-7.
133. Xu, Q., G. Schett, C. Li, Y. Hu et G. Wick (2000). "Mechanical stress-induced heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Rac and Ras small G proteins but not mitogen-activated protein kinases." Circ Res **86**(11): 1122-8.
134. Yang, Y. L. et M. T. Lin (1999). "Heat shock protein expression protects against cerebral ischemia and monoamine overload in rat heatstroke." Am J Physiol **276**(6 Pt 2): H1961-7.

135. Zarb, G. A. et A. Schmitt (1991). "Osseointegration and the edentulous predicament. The 10-year-old Toronto study." Br Dent J **170**(12): 439-44.
136. Zhang, R., W. Verkruysse, G. Aguilar et J. S. Nelson (2005). "Comparison of diffusion approximation and Monte Carlo based finite element models for simulating thermal responses to laser irradiation in discrete vessels." Phys Med Biol **50**(17): 4075-86.

---

**DESMONS Sophie.**

**Préconditionnement Laser en site osseux membraneux.**

156 pages – 136 références – 57 illustrations - Université de Lille II - 2008.

---

**Objectif:** L'application d'un stress supraphysiologique (préconditionnement) induit une résistance cellulaire et tissulaire augmentée face à une agression secondaire. Cette réponse, validée sur différents tissus mous, est évaluée ici en site osseux membraneux à l'aide d'un preconditionnement laser. L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact d'un preconditionnement laser en site osseux lésé par une irradiation aux rayons X. Cette étude comporte 2 volets : un suivi *in vivo* du réseau vasculaire osseux et une étude immunohistochimique visant à mettre en évidence la production de HSP70.

**Matériels et Méthodes:** Le tir laser est paramétré pour induire une augmentation contrôlée de la température osseuse. La cicatrisation osseuse est évaluée *in vivo* par l'étude de la vascularisation après irradiation par rayons X. Des chambres optiques implantées sur le crâne de 20 lapins permettent l'observation hebdomadaire du plexus vasculaire pendant 12 semaines. L'évolution du réseau vasculaire (densité vasculaire (DV) et critères morphologiques) est suivie sur quatre groupes : #1 : groupe contrôle (n=5); #2: traitement laser (n=5); #3 : irradiation par rayons X (n=5) ; #4 : preconditionnement laser avant irradiation par rayons X (n=5). Les analyses histologiques et immunohistochimiques sur tissu osseux sont mises en place.

**Résultats:** Un système diode laser (815nm, 36J/cm<sup>2</sup>) est retenu pour le preconditionnement. Le traitement laser est une méthode de chauffage contrôlé et reproductible. L'évolution du réseau vasculaire est stable pour le groupe #1 et pour le groupe #2. La vascularisation des groupes #3 et #4 chute significativement par rapport au groupe #1. Cependant, la diminution de la vascularisation est limitée pour le groupe #4 vs. groupe #3 (p<0.05). Les analyses histologiques confirment ces résultats. L'analyse immunohistochimique montre un marquage positif de HSP70 au niveau du réseau vasculaire osseux 18h après une irradiation laser.

**Discussion:** Le preconditionnement laser est une méthode de chauffage finement contrôlée qui préserve la vascularisation en site osseux irradié. Cette approche novatrice montre une potentialisation de la cicatrisation osseuse dont le système vasculaire a été lésé. Ce mécanisme de pré traitement représente une nouvelle approche dans l'amélioration de la cicatrisation osseuse mettant en avant l'utilisation des capacités d'auto protection du réseau vasculaire osseux.

---

Rubrique de classement : Sciences Biologiques

---

**Mots clés :** diode laser, cicatrisation osseuse, modèle animal, stress thermique, preconditionnement.

---

**Key words:** diode laser, bone healing, animal model, thermal stress, preconditioning

---

Adresse de l'auteur : 271, Bd Victor Hugo. 59000 Lille.

---