

UNIVERSITE DE NANTES

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

Année 2014

N° : 031

**PARTICIPATION A LA MISE EN EVIDENCE DES
EFFETS DE L'IRRADIATION SUR LA
MICROVASCULATISATION OSSEUSE.**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

*Présentée
et soutenue publiquement par*

**HAYS ALEXANDRA
15/12/1989**

Le lundi 6 octobre 2014 devant le jury ci-dessous

Président : M. le Pr Bernard GIUMELLI
Assesseur : M. le Dr Laurent LE GUEHENNEC

Directeur : M. le Pr Pierre WEISS
Co-directeur : Mme. le Dr Pauline BLERY

UNIVERSITE DE NANTES	
Président	Pr. LABOUX Olivier
FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE	
Doyen	Pr. AMOURIQ Yves
Assesseurs	Dr. RENAUDIN Stéphane Pr. SOUEIDAN Assem Pr. WEISS Pierre
Professeurs des Universités Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	
Monsieur AMOURIQ Yves Madame ALLIOT-LICHT Brigitte Monsieur GIUMELLI Bernard	Monsieur LESCLOUS Philippe Madame PEREZ Fabienne Monsieur SOUEIDAN Assem Monsieur WEISS Pierre
Professeurs des Universités	
Monsieur BOHNE Wolf (Professeur Emérite) Monsieur JEAN Alain (Professeur Emérite)	Monsieur BOULER Jean-Michel
Praticiens Hospitaliers	
Madame DUPAS Cécile	Madame LEROUXEL Emmanuelle
Maîtres de Conférences Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	Assistants hospitaliers universitaires des C.S.E.R.D.
Monsieur AMADOR DEL VALLE Gilles Madame ARMENGOL Valérie Monsieur BADRAN Zahi Monsieur BODIC François Madame DAJEAN-TURTAUD Sylvie Monsieur DENIAUD Joël Madame ENKEL Bénédicte Monsieur GAUDIN Alexis Monsieur HOORNAERT Alain Madame HOUCHMAND-CUNY Madeline Madame JORDANA Fabienne Monsieur KIMAKHE Saïd Monsieur LAGARDE André Monsieur LE BARS Pierre Monsieur LE GUEHENNEC Laurent Madame LOPEZ-CAZAUX Séréna Monsieur MARION Dominique Monsieur NIVET Marc-Henri Monsieur RENAUDIN Stéphane Madame ROY Elisabeth Monsieur STRUILLOU Xavier Monsieur UNGER François Monsieur VERNER Christian	Madame BOEDEC Anne Monsieur CLEE Thibaud Monsieur DAUZAT Antoine Madame DAZEL LABOUR Sophie Monsieur DEUMIER Laurent Monsieur LE BOURHIS Antoine Monsieur KOUADIO Kouakou (assistant associé) Monsieur LANOISELEE Edouard Madame LEGOFFE Claire Madame MACON Claire Madame MALTHIERY Eve Madame MELIN Fanny Madame MERAMETDJIAN Laure Monsieur PILON Nicolas Monsieur PRUD'HOMME Tony Monsieur RESTOUX Gauthier Madame RICHARD Catherine Monsieur ROLOT Morgan

Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur GIUMELLI Bernard

Professeur des Universités.

Praticien Hospitalier des centres de soins, d'enseignement et de recherche dentaires.

Docteur d'Etat en odontologie.

Chef du département de prothèse.

- NANTES -

Pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse.

Merci pour la richesse de votre enseignement, tant humain que clinique, et votre bienveillance tout au long de ces années.

Veillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de ma profonde estime.

A Monsieur le Professeur WEISS Pierre

Professeur des Universités.

Praticien Hospitalier des centres de soins, d'enseignement et de recherche dentaires.

Docteur d'Etat en odontologie.

Directeur du Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire - LIOAD -

Vice Doyen recherche de l'UFR d'Odontologie.

Département des sciences anatomiques.

- NANTES -

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse.

Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire.

Veillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon estime.

A Monsieur le Docteur LE GUEHENNEC Laurent

Maitre de Conférence des Universités.

Praticien Hospitalier des centres de soins, d'enseignement et de recherche dentaires.

Docteur d'Etat en odontologie.

Département de prothèse.

- NANTES -

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Merci pour votre enseignement durant ces nombreuses années.

Veillez trouvez ici le témoignage de mon profond respect et de ma gratitude.

A Madame le Docteur BLERY Pauline

Docteur d'Etat en odontologie.

Ancien Assistant Hospitalier Universitaire des centres de soins d'enseignement et de recherche dentaire.

Département de prothèse.

- NANTES -

Pour m'avoir fait l'honneur de codiriger cette thèse.

Pour m'avoir guidée avec bienveillance à travers les méandres de la recherche.

Pour tes corrections méthodiques, tes explications, tes conseils, ta patience, et ta disponibilité.

Pour tes enseignements cliniques tout au long de mes études.

Trouve ici le témoignage de mon infinie reconnaissance et de toute mon estime.

A mes parents et à ma sœur, pour leur amour, leur soutien, leurs conseils. Vous qui êtes toujours présents pour moi et qui m'avez permis d'en arriver là. Je ne saurais vous dire à quel point je vous suis reconnaissante pour tout.

A Edouard. Tu sais que je manie mieux les mots pour énoncer des faits ou raconter des histoires que pour exprimer mes sentiments. Je sais la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés.

A mes amis, pour tous les moments partagés depuis de nombreuses années.

A mes enseignants et confrères, pour tout ce que j'ai appris à leurs côtés, tant humainement que professionnellement.

A l'équipe du LIOAD, pour leur accueil et leurs précieuses explications à la novice que j'étais. Merci de m'avoir accompagnée dans l'univers tortueux de la recherche en musique et à grand renfort de bonne humeur.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	15
2. RAPPELS ANATOMIQUES et HISTOLOGIQUES	17
2.1. Anatomie et histologie osseuse	17
2.1.1. Anatomie de l'os mandibulaire humain	17
2.1.2. Histologie de l'os mandibulaire humain	18
2.1.3. Anatomie de la mandibule chez le rat	20
2.2. Anatomie et histologie vasculaire	21
2.2.1. Anatomie de la vascularisation de la mandibule	21
2.2.2. Histologie vasculaire	22
3. LA RELATION OS-VAISSEAU DANS LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE	25
3.1. La vascularisation osseuse, pilier des fonctions squelettiques	25
3.2. Bases moléculaires des interactions vasculo-osseuses	25
3.3. Le vaisseau au centre de l'unité de remodelage osseux	26
3.4. Rôle de la vascularisation dans la réparation / cicatrisation osseuse	27
3.5. Le vaisseau osseux au centre des niches de cellules souches hématopoïétiques	28
3.5.1. Les niches de cellules souches hématopoïétiques	28
3.5.2. Relations spatiales et fonctionnelles entre les CSH, les cellules osseuses et la vascularisation	29
4. TECHNIQUES D'EXPLORATION DU RESEAU VASCULAIRE OSSEUX	32
4.1. Techniques de quantification de la microvascularisation	32
4.1.1. Microangiographie	32
4.1.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)	33
4.1.3. Microscopie optique	35
4.1.4. Micro Computed Tomography (μ CT)	36
4.1.5. Synchrotron Micro Computed Tomography (SR μ CT)	41
4.2. Exploration de la fonction vasculaire	44
4.2.1. Laser Doppler	44
4.2.2. Méthodes basées sur la cinétique des traceurs	44
4.2.3. Blocage artériolaire de microsphères	45
4.2.4. Microscopie intravitale	45
4.2.5. Imagerie par résonance magnétique et Tomographie par émission de positrons (IRM et TEP)	46
5. CONSEQUENCES DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES TISSUS SAINS	47
5.1. Effets biologiques des radiations ionisantes	47
5.1.1. Lésions moléculaires	48
5.1.2. Lésions cellulaires	49
5.1.3. Lésions tissulaires	49
5.1.4. Manifestations cliniques	49
5.2. Physiopathologie du tissu osseux irradié	50
5.2.1. Hypocellularité osseuse	51
5.2.2. Fibrose médullaire	52
5.2.3. Ischémie vasculaire	52
5.2.4. Altérations de la structure osseuse	54
5.2.5. L'ostéoradionécrose mandibulaire (ORN)	55
5.3. Effets des radiations ionisantes sur la microvascularisation osseuse	62
5.3.1. Atteinte vasculaire radio induite	62
5.3.2. Place de l'atteinte vasculaire dans la physiopathologie du tissu osseux irradié	65

6.	L'EXPERIMENTATION	67
6.1.	Justification et objectifs de l'étude	67
6.2.	Matériels et méthodes	67
6.2.1.	Modèle d'Ostéoradionécrose mandibulaire chez le rat	67
6.2.2.	μ CT	71
6.2.3.	Inclusion	71
6.2.4.	Coupes	72
6.2.6.	Analyses immunohistochimiques (IHC)	75
6.2.7.	Analyses de l'activité ostéoclastique	75
6.2.8.	Analyses en microscopie électronique à balayage (MEB)	76
6.2.9.	Analyses statistiques	77
6.3.	Résultats	77
6.3.1.	Altération de la cicatrisation	77
6.3.2.	Arrêt de la croissance des incisives en site irradié	78
6.3.3.	Altération de la moelle osseuse	79
6.3.4.	Présence d'un défaut osseux basilaire chez les rats irradiés	80
6.3.5.	Autres altérations de la structure osseuse	81
6.3.6.	Augmentation de l'activité ostéoclastique	82
6.3.7.	Effet des rayonnements ionisants sur les éléments microvasculaires	83
6.4.	Discussion	86
7.	CONCLUSION	88
8.	BIBLIOGRAPHIE	89
9.	ANNEXES	97
9.1.	Protocole d'inclusion en résine Technovit®	97
9.1.1.	Fixation	97
9.1.2.	Déshydratation	97
9.1.3.	Imprégnation	97
9.1.4.	Inclusion	97
9.2.	Coloration au pentachrome de MOVAT	99
9.3.	Coloration à l'hématoxyline-éosine	100
9.4.	Protocole d'immunohistochimie : marquage CD31	101
9.5.	Protocole de révélation de l'activité de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP)	103

TABLE DES ABREVIATIONS

μ CT : Micro Computed Tomography
2D : 2 Dimensions
3D : 3 Dimensions
AAI : Artère Alvéolaire Inférieure
AC : Anticorps
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ATM : Articulation Temporo Mandibulaire
BMP : Bone Morphogenic Factor
BMU : Bone Multicellular Units
BSA : Bovin Serum Albumin
CD31 : Cluster of Differentiation 31
CD34 : Cluster of Differentiation 34
CMS : Cellules Musculaires Lisses
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
DAB : Diaminobenzidine
ESRF : European Synchrotron Radiation Facility
Ext : Extrait
Flk1 : Fetal Liver Kinase 1
HE : Hématoxyline-Eosine
IgG : Immunoglobuline G
IHC : Immunohistochimie
Inj : Injecté
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IRSN : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire
LIOAD : Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire
MCH : Méthylcyclohexane
MEA : Monoethanolamine
MEB : Microscope Electronique à Balayage
MEC : Matrice Extracellulaire
NE : Non Extrait
NI : Non injecté
OB : Ostéoblastes
OC : Ostéoclastes
Ocy : Ostéocytes
ORN : Ostéoradionécrose
PBS : Phosphate Buffered Saline
PFA : Paraformaldéhyde
PMMA : Polyméthacrylate de méthyle
RIF : Radiation Induced Fibrosis
ROS : Reactive Oxygen Species
SOLEIL : Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire
SR μ CT : Synchrotron Micro Computed Tomography
T° : Température
TEP : Tomographie par Emission de Positrons
TRAP : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
VADS : Voies Aérodigestives Supérieures
VCC : Vascular Corrosion Cast
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR3 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
VN : Nombre de Vaisseaux
VS : Surface vasculaire
VSp : Séparation Vasculaire
VV : Volume Vasculaire

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de la mandibule de l'adulte [21]	17
Figure 2 : Branches du Nerf mandibulaire (V3) [114]	18
Figure 3 : Ossification de membrane [6]	18
Figure 4 : Les cellules du tissu osseux [68]	19
Figure 5 : Jonction entre l'os compact et l'os spongieux [68]	20
Figure 6 : Diagramme d'un crâne de rat [48]	20
Figure 7 : Vue supérieure d'une mandibule de rat [89]	21
Figure 8 : Vue latérale droite d'une mandibule de rat [89]	21
Figure 9 : Vascularisation artérielle de la mandibule	21
Figure 10 : Artère de moyen calibre et ses trois tuniques : intima, média, adventice [91]	22
Figure 11 : Structure d'un endothélium vasculaire [94]	23
Figure 12 : Sinusoïde veineux et capillaire artériel ($\times 40$) au sein de la moelle hématopoïétique [61]	24
Figure 13 : Différences d'organisation entre le réseau capillaire artériel et le réseau capillaire sinusoïde [63]	24
Figure 14 : Capillaires au sein des BMU corticales [78]	27
Figure 15 : Etapes de cicatrisation osseuse suite à une fracture [16]	28
Figure 16 : Niches hématopoïétiques : ancienne et nouvelle visions de leur organisation [95]	31
Figure 17 : Réseau vasculaire au sein de l'os trabéculaire (microangiographie) [7]	33
Figure 18 : Mise en évidence de la vascularisation osseuse d'une mandibule de rat (MEB) [LIOAD]	33
Figure 19 : Vascularisation des os plats (moulage vasculaire par corrosion et MEB) [77]	34
Figure 20 : Vaisseaux osseux mandibulaires (coupes histologiques chez le rat) [LIOAD]	35
Figure 21 : Mise en évidence de la vascularisation osseuse par marquage CD31 de la paroi endothéliale [LIOAD]	36
Figure 22 : Principe de la microtomographie par rayons X [113]	37
Figure 23 : Principe de la microtomographie par rayons X [113]	37
Figure 24 : Influence du choix de la taille des voxels [31]	38
Figure 25 : Influence du seuillage [31]	38
Figure 26 : European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) Grenoble [33]	41
Figure 27 : La vascularisation tibiale (SR μ CT) [39]	41
Figure 28 : Tableau résumé des techniques d'analyse de l'anatomie vasculaire osseuse	42
Figure 29 : Représentation schématique de l'équipement laser doppler [87]	44
Figure 30 : Vascularisation d'un cortex de souris (microscopie intravitale) [104]	45
Figure 31 : Action des rayonnements ionisants sur la matière vivante : succession des phénomènes [15]	48
Figure 32 : Hypocellularité osseuse post irradiation [67]	51
Figure 33 : Fibrose médullaire post irradiation [LIOAD]	52
Figure 34 : Effets de l'irradiation sur la vascularisation osseuse [101]	53
Figure 35 : Ostéoradionécrose de la mandibule [12]	54
Figure 36 : Exposition osseuse endobuccale [82]	56
Figure 37 : Scanner mandibulaire horizontal, foyer d'ostéoradionécrose avec séquestre cortical interne au niveau de la branche horizontale gauche [85]	56
Figure 38 : Fracture pathologique bifocale de la branche horizontale droite avec séquestration [85]	57
Figure 39 : Physiopathologie de l'ORN selon Marx [66]	58
Figure 40 : Sténose de l'artère alvéolaire inférieure (AAI) suite à irradiation [12]	59
Figure 41 : Théorie RIF [66]	61
Figure 42 : Principaux effets des radiations ionisantes sur l'endothélium vasculaire [73]	62
Figure 43 : Place de l'atteinte vasculaire dans la physiopathologie du tissu osseux irradié : proposition au vu des données actuelles	66
Figure 44 : Protocole d'irradiation des rats	68
Figure 45 : Extractions de la deuxième molaire mandibulaire gauche	69
Figure 46 : Injection du sulfate de Baryum	69
Figure 47 : Design expérimental	70
Figure 48 : Image d'un volume 3D et coupe longitudinale 2D d'une mandibule après perfusion avec du sulfate de baryum et acquisition au microscanner 1272 à une résolution de 6 micromètres	71
Figure 49 : Niveaux de coupe	72
Figure 50 : Coupe au niveau incisif (niveau 1) : mise en évidence des structures	72
Figure 51 : Coupe au niveau molaire (niveau 2) : mise en évidence des structures	73
Figure 52 : Polycut Leica®	73

Figure 53 : Mise en place de l'échantillon	73
Figure 54 : Automate de coloration Thermo Fischer Scientific	74
Figure 55 : Montage entre lame et lamelle (coloration MOVAT)	74
Figure 56 : Lames montées (coloration MOVAT)	74
Figure 57 : Marquage CD31 de la paroi endothéliale capillaire (mandibule de rat non décalcifiée)	75
Figure 58 : Marquage TRAP sans contre-coloration au niveau de l'alvéole d'une dent extraite en site irradié (mandibule de rat non décalcifiée)	75
Figure 59 : Marquage TRAP avec contre-coloration autour de l'incisive en site irradié (mandibule de rat non décalcifié)	75
Figure 60 : Métalliseur carbone	76
Figure 61 : Mise en place des échantillons sous la mine carbone pour la métallisation	76
Figure 62 : Mise en place des échantillons métallisés au carbone dans le MEB	76
Figure 63 : Comparaison de la cicatrisation post extraction (photos)	77
Figure 64 : Comparaison de la cicatrisation post extraction (μ CT)	77
Figure 65 : Incisives des rats irradiés à 50 Gy	78
Figure 66 : Minéralisation de la pulpe incisive en site irradié (MOVAT)	78
Figure 67 : Désorganisation cellulaire : perte de la structure en palissade des améloblastes	79
Figure 68 : Fibrose médullaire : augmentation du nombre d'adipocytes suite à l'irradiation (HE)	79
Figure 69 : Fibrose médullaire : raréfaction cellulaire (HE)	79
Figure 70 : Défaut osseux basilaire : vue inférieure (micro-scanner)	80
Figure 71 : Défaut osseux basilaire : coupe frontale (microscanner)	80
Figure 72 : Défaut osseux basilaire : coupe frontale	80
Figure 73 : Défaut osseux basilaire : coupe frontale (MEB)	81
Figure 74 : Présence d'ostéoclastes à proximité du défaut osseux	81
Figure 75 : Altération de l'os suite à irradiation	81
Figure 76 : Augmentation de l'activité ostéoclastique au niveau du défaut basilaire	82
Figure 77 : Augmentation de l'activité ostéoclastique au niveau d'une alvéole extraite	82
Figure 78 : Augmentation de l'activité ostéoclastique au niveau d'une alvéole extraite	82
Figure 79 : Vascularisation mandibulaire. Reconstruction 3D au micro scanner	83
Figure 80 : Tableau récapitulatif des résultats concernant les paramètres de microvascularisation	84
Figure 81 : Significativité des résultats	85

1. INTRODUCTION

Les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) sont des tumeurs se développant au niveau de la cavité buccale et de l'hypopharynx [49]. En 2008, l'estimation des nouveaux cas s'élevait à 16 000 par an, plaçant les cancers des VADS au cinquième rang des cancers les plus fréquents en France. La mortalité est estimée à 5000 patients par an. Il s'agit de la 7^e cause de mortalité chez les hommes [49].

Le tabac et l'alcool sont les deux principaux facteurs de risque de ces cancers, l'action des deux se potentialisant. Un mauvais état bucco-dentaire constitue également un facteur favorisant le développement de ces cancers [49].

Le traitement de première intention des cancers des VADS est la chirurgie resectrice et/ou la radiothérapie [49]. L'efficacité de la radiothérapie est basée sur un différentiel des capacités de réparation subléthales entre cellules cancéreuses et cellules saines. Les cellules non cancéreuses réparent plus efficacement les lésions induites par les radiations. Leur taux de mortalité est donc inférieur à celui des cellules tumorales [79]. La radiothérapie est indispensable pour le traitement des tumeurs des VADS. Néanmoins, malgré les récents progrès techniques, il existe toujours une toxicité des radiations ionisantes, à l'origine de séquelles précoces puis tardives [26, 79]. La tolérance des tissus sains inclus dans le volume cible est donc à considérer pour l'établissement du protocole de radiothérapie [79].

La séquelle la plus sérieuse suite à une radiothérapie de la région cervico-faciale est l'ostéoradionécrose (ORN) [26]. Cette séquelle tardive est irréversible et ne régresse jamais. Elle évolue soit vers la stabilisation, soit vers l'aggravation [79]. Elle requiert souvent une thérapeutique agressive ou mutilante [79], comme une résection chirurgicale de la mandibule [26]. De plus, les techniques de reconstruction osseuse suite à la chirurgie sont limitées. L'ORN a donc des répercussions esthétiques et fonctionnelles lourdes [51].

La physiopathologie de l'ORN, bien qu'étudiée depuis une centaine d'années [86], n'est pas encore bien comprise [26]. Il est aujourd'hui admis que la genèse des effets tardifs radio induits fait intervenir une hypocellularité et un microenvironnement hostile (dérèglement des interactions cellulaires et matricielles, inflammation chronique) [79]. L'étiologie ischémique post-irradiation est également souvent évoquée ; certains auteurs ayant mis en évidence un lien direct entre lésions vasculaires radio-induites et lésions parenchymales [79].

Les conséquences de la radiothérapie sur la vascularisation sont connues depuis longtemps, néanmoins, les mécanismes sous tendant les lésions vasculaires radio-induites ne sont pas complètement élucidés [87]. Il est aujourd'hui démontré que le vaisseau osseux

possède un rôle beaucoup plus large que sa simple fonction circulatoire [87]. Il s'agit d'un composant essentiel du métabolisme osseux et médullaire [82, 87]. Son implication dans la genèse des effets osseux tardifs radio induits et plus particulièrement de l'ORN, est actuellement en cours d'étude [16, 26, 87].

De brefs rappels concernant l'anatomie et l'histologie, osseuse et vasculaire, de la mandibule, permettront de mieux appréhender les rapports étroits entre le tissu osseux et les structures vasculaires dans un contexte physiologique. La mise en évidence des effets de l'irradiation sur la vascularisation osseuse nécessite de pouvoir quantifier les vaisseaux et/ou leur fonction dans des conditions physiologiques et pathologiques. Les différents outils et techniques à disposition seront donc revus, avec leurs avantages et leurs limites. Cela permettra d'aborder les effets de l'irradiation à doses thérapeutiques sur les tissus vasculaires et osseux. Un intérêt particulier sera porté à la place de l'atteinte vasculaire dans la physiopathologie du tissu osseux irradié. Enfin, l'expérimentation réalisée au LIOAD (Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire) sera présentée. Elle combine l'utilisation du microscanner, de l'histologie, de l'immunohistochimie et de la microscopie électronique à balayage pour analyser et quantifier les effets de l'irradiation sur la microvascularisation mandibulaire dans un modèle animal d'ORN.

2. RAPPELS ANATOMIQUES et HISTOLOGIQUES

2.1. Anatomie et histologie osseuse

2.1.1. Anatomie de l'os mandibulaire humain

La mandibule est un os impair, médian et symétrique. Il s'agit du seul os mobile de la face. Il s'articule avec les os temporaux en formant l'articulation temporo-mandibulaire (ATM). A lui seul, il constitue le squelette de l'étage inférieur de la face [21]. L'os mandibulaire a une forme de fer à cheval dont les extrémités se redressent vers le haut, et comprend trois parties : un corps et deux branches unis par deux angles mandibulaires (figure 1) [54].

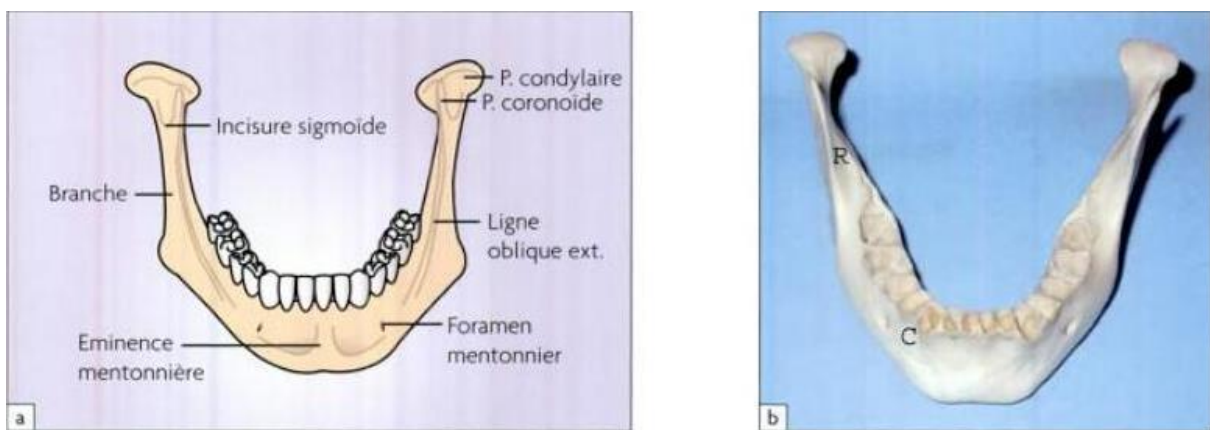


Figure 1 : Anatomie de la mandibule de l'adulte [21]

a : schéma de la mandibule avec ses différents repères

b : vue antérieure de la mandibule

Le bord supérieur du corps mandibulaire constitue la partie alvéolaire, support des dents de l'arcade inférieure (figure 1) [21].

La mandibule est innervée par le Nerf alvéolaire Inférieur (V3), la branche la plus volumineuse de ganglion trigéminal. Il pénètre dans l'os par le foramen mandibulaire sur la face interne des branches montantes, puis il chemine sous les apex des dents (qu'il innerve) au sein du canal mandibulaire, pour émerger sur la face externe du corps mandibulaire en regard de la 2^e prémolaire, par le foramen mentonnier (figure 2) [21].

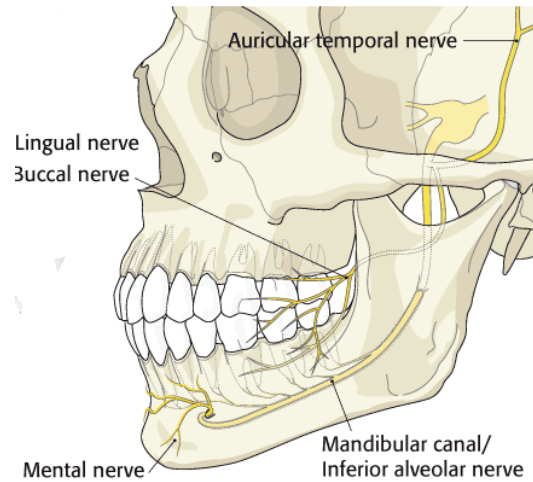


Figure 2 : Branches du Nerf mandibulaire (V3) [114]

2.1.2. Histologie de l'os mandibulaire humain

La mandibule procède d'une ossification de membrane à partir de deux points d'ossification symétriques (un à droite et un à gauche). Aux alentours du quarantième jour in utéro, un point d'ossification apparaît en arrière de la future région trou mentonnier, en périphérie du cartilage de Meckel. La symphyse mentonnière est le témoin de la fusion des héli-mandibules fœtales [54]. Les cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif se différencient en ostéoblastes et vont synthétiser une substance pré-osseuse (ostéoïde) rapidement minéralisée. Cela mènera à la formation d'ostéoplastes. Les ostéoblastes plus différenciés se retrouvent entourés de matrice osseuse, et deviennent des ostéocytes. Les ostéoplastes se logent au sein de travées plus ou moins anastomosées (figure 3). Le remodelage de ces travées par résorption ostéoclastique puis ostéogénèse aboutissent ultérieurement à la constitution d'un os spongieux [60].

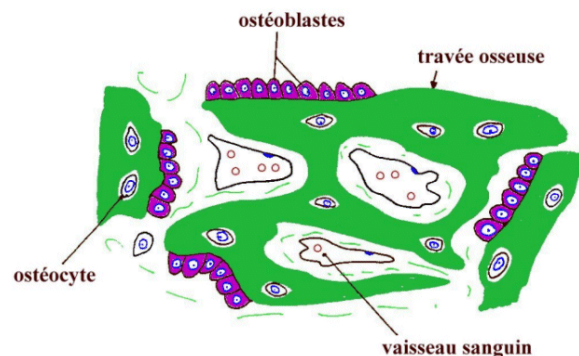


Figure 3 : Ossification de membrane [6]

Il existe deux constituants élémentaires du tissu osseux : la matrice osseuse et les cellules osseuses. La matrice se compose d'éléments organiques (fibres, substance fondamentale) minéralisés par les sels minéraux sous forme d'apatites carbonatées. Les cellules osseuses, ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes (figure 4), assurent le remodelage continu du tissu osseux. Les ostéoblastes sont des cellules osseuses jeunes, responsables de l'élaboration de la matrice du tissu osseux. Les ostéocytes représentent les cellules du tissu osseux constitué, ils sont situés au sein de logettes (ostéoplastes). Ils peuvent contribuer à la formation ou à la destruction osseuse. Les ostéoclastes, quant à eux, sont des cellules multinucléées responsables de la résorption osseuse [6].

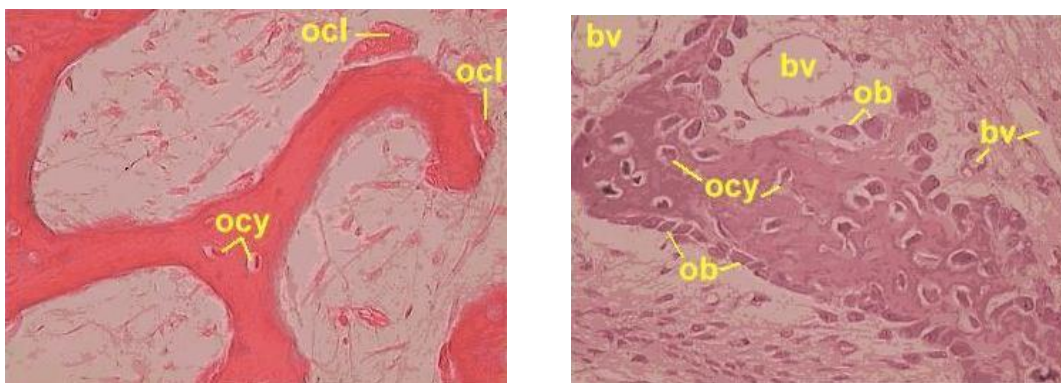


Figure 4 : Les cellules du tissu osseux [68]

Ob : ostéoblastes Ocy : ostéocytes
 Ocl : ostéoclastes Bv : vaisseaux osseux

La mandibule est donc un os trabéculaire possédant une corticale osseuse en périphérie. D'un point de vue histologique, l'os spongieux est composé de trabécules de matrice osseuse minéralisée séparées par des espaces qui contiennent la moelle osseuse (figure 5). Les trabécules sont agencées de manière à permettre à l'os de résister le mieux possible aux contraintes subies [68].

La corticale présente une structure composée d'ostéons ou systèmes de Havers (figure 5). Chaque unité est formée de plusieurs couches de lamelles concentriques formées de matrice osseuse [68].

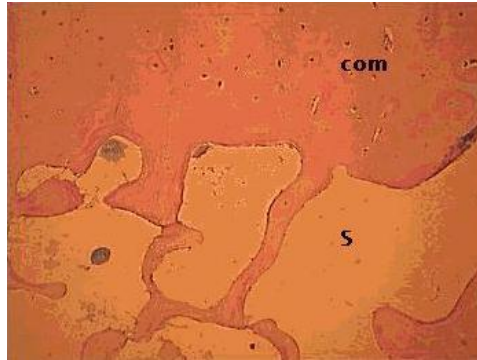


Figure 5 : Jonction entre l'os compact et l'os spongieux [68]

Com : os compact
S : os spongieux

2.1.3. Anatomie de la mandibule chez le rat

La structure mandibulaire du rat est similaire à celle de l'homme, mais présente quelques différences. Si, comme chez l'homme, il s'agit d'un os impair, médian, symétrique et mobile, sa structure est plus allongée (figure 7). L'os est également plus compact, avec une corticale très épaisse et un os trabéculaire réduit [48].

L'une des différences majeures concerne les dents. Le rat possède six molaires et deux incisives sur chaque arcade. Les prémolaires et les canines n'existent pas chez les rongeurs. A la place se trouve un large diastème (figures 7 et 8). Les incisives du rat présentent la particularité d'être en croissance permanente [48]. Les incisives permettent au rat de ronger, et sont donc usées par cette fonction. Leur croissance continue leur permet de maintenir une taille constante [48]. La taille moyenne des incisives mandibulaires du rat est de 7 mm de long [48]. La majeure partie des incisives se situe donc au sein de l'os mandibulaire, cheminant sous les molaires (figure 6).



Figure 6 : Diagramme d'un crâne de rat [48]

Une partie de l'os alvéolaire a été retirée pour mettre en évidence la longueur des incisives.
En jaune : les incisives
En bleu : la mandibule

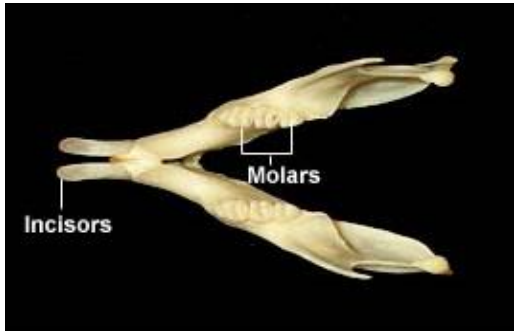


Figure 7 : Vue supérieure d'une mandibule de rat [89]



Figure 8 : Vue latérale droite d'une mandibule de rat [89]

2.2. Anatomie et histologie vasculaire

2.2.1. Anatomie de la vascularisation de la mandibule

La mandibule possède deux apports vasculaires, l'un externe, l'autre endo-osseux. Tous deux sont issus de l'artère carotide externe. Le réseau externe comprend le réseau périosté externe et interne formés des artères sous mentale, massétérine, ptérygoidienne, faciale et linguale (figure 9A). Les artères de moyen calibre pénètrent dans la corticale, se ramifient en artérioles puis en capillaires [21]

L'apport vasculaire interne comprend l'artère du condyle et l'artère alvéolaire inférieure (figure 9B). Cette dernière est issue de l'artère maxillaire et suit le trajet du nerf alvéolaire inférieur dans le canal mandibulaire. Elle assure la majorité de l'apport vasculaire mandibulaire et celui des organes dentaires [21].

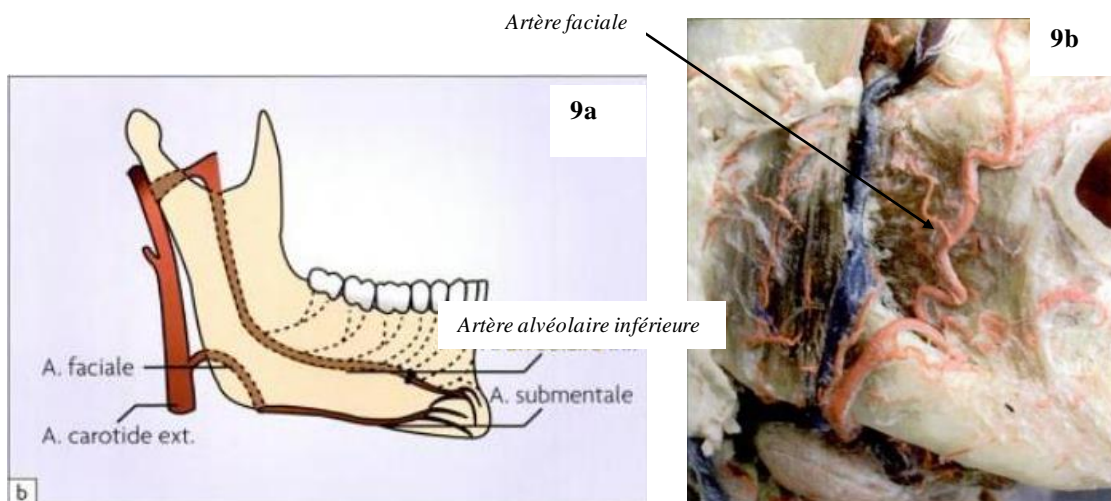


Figure 9 : Vascularisation artérielle de la mandibule

Fig 9A : Artère alvéolaire inférieure [21]

Fig 9B : Artère faciale [44]

L'organisation du réseau capillaire diffère selon le type d'os dans lequel il est situé. Dans l'os cortical, les capillaires issus de la vascularisation endo-osseuse vont cheminer au centre des canaux de Havers (parallèlement au grand axe des canaux). Ils vont s'anastomoser avec les capillaires des canaux de Volkmann. Ces derniers sont issus de la vascularisation externe, et sont perpendiculaires au même axe. Il y a donc un double apport médullaire et périosté [61].

Au sein de l'os trabéculaire, les capillaires artériels classiques s'anastomosent aux capillaires sinusoides veineux [87]. Les deux types de capillaires cheminent à travers les travées osseuses.

2.2.2. Histologie vasculaire

Les vaisseaux, tout au long de l'arbre vasculaire, présentent une structure composée de trois tuniques (figure 10), à l'exception des capillaires. Il s'agit de l'intima, la media et l'adventice. L'intima est la tunique au contact du sang et il s'agit d'un tissu très actif sur la plan métabolique. La média constitue la charpente musculo-élastique des vaisseaux. La quantité de fibres musculaires et élastiques dépend du type de vaisseaux. L'adventice est une zone d'innervation et de vascularisation importante. Elle permet l'apport nutritif des vaisseaux et leur motricité [96].

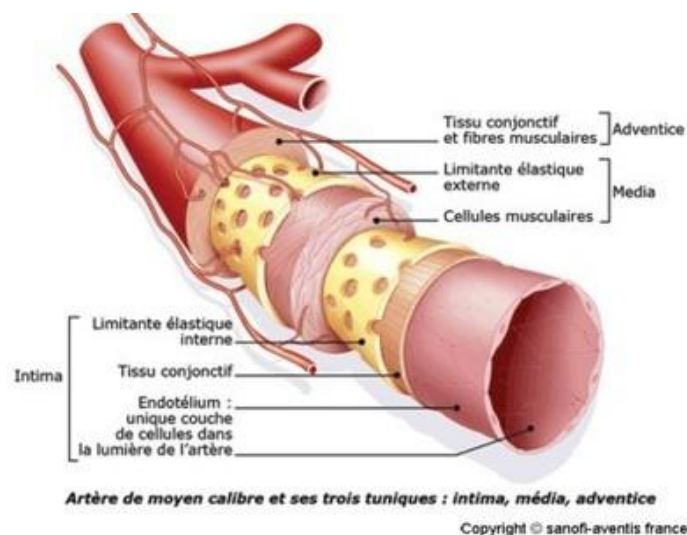


Figure 10 : Artère de moyen calibre et ses trois tuniques : intima, média, adventice [91]

Au fur et à mesure de l'arborisation du réseau vasculaire, l'histologie des vaisseaux évolue pour se réduire à sa plus simple expression au niveau des capillaires, limitée à une lame basale et à une couche de cellules endothéliales jointives (figure 11) [87].

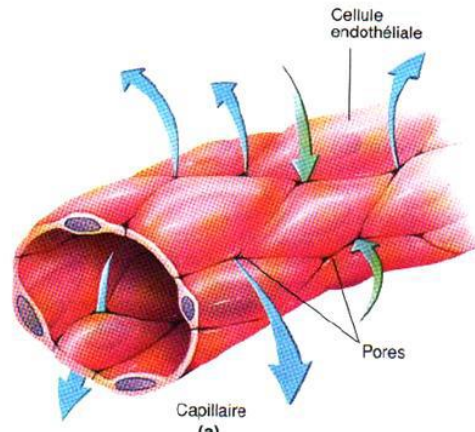


Figure 11 : Structure d'un endothélium vasculaire [94]

La mise à disposition de l'oxygène nécessaire au métabolisme tissulaire dépend de la présence de vaisseaux fonctionnels. Les capillaires, lieux d'échange entre le sang et les tissus (figure 11), jouent donc un rôle prépondérant.

Le réseau capillaire médullaire est composite. Il comprend des capillaires artériels classiques, d'un diamètre de l'ordre de 5 à 10 μm , et des capillaires sinusoides veineux de 20 à 30 μm de diamètre (figure 12) [106].

Les capillaires artériels constituent l'extrémité distale de l'arbre vasculaire et sont donc constitués d'une intima et d'un ou deux péricytes [61]. Les péricytes présentent des similitudes avec les cellules musculaires lisses (CMS) et échangent avec les cellules endothéliales [87]. Le réseau capillaire artériel présente une organisation arborescente (figure 13C) [63].

Les sinusoides veineux sont plus nombreux que les capillaires artériels. Le réseau sinusoides est isotrope et disposé en réseau maillé (et non branché) qui se draine directement dans les veines corticales (figures 13A et 13B) [63].

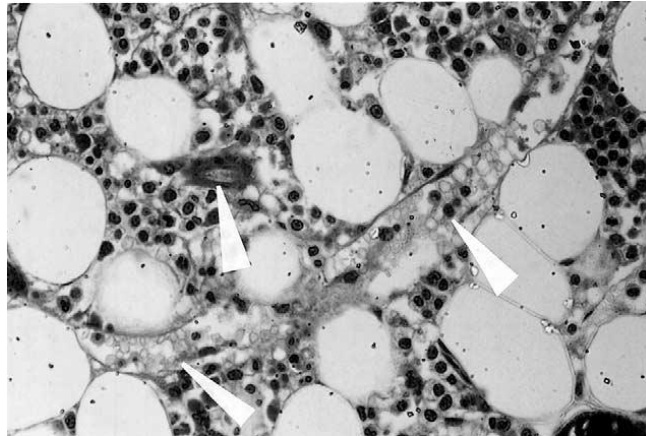


Figure 12 : Sinusoïde veineux et capillaire artériel ($\times 40$) au sein de la moelle hématopoïétique [61]

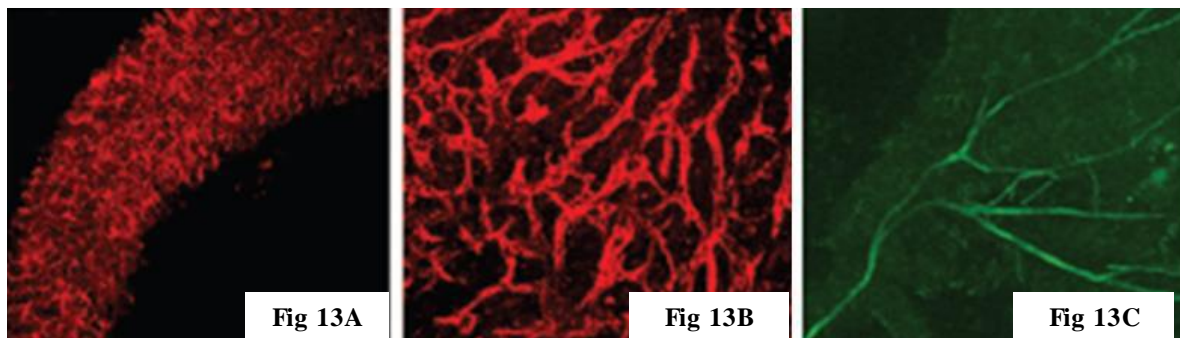


Figure 13 : Différences d'organisation entre le réseau capillaire artériel et le réseau capillaire sinusoïde [63]

Fig 13A et 13B : capillaires sinusoides de la cavité médullaire (Ac-LDL)

Fig 13C : capillaires classiques (Tie2).

3. LA RELATION OS-VAISSEAU DANS LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE

L'os est un tissu très vascularisé, qui se caractérise par un turn-over intense entre formation et résorption. L'endothélium vasculaire fait partie intégrante du tissu osseux et joue un rôle prépondérant dans les interactions avec les cellules osseuses. Il est désormais clair, que les cellules endothéliales participent au métabolisme osseux local. Elles agissent de manière paracrine sur d'autres cellules du tissu osseux via des facteurs humoraux, tels les facteurs de croissance et chimiokines [18]. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces interactions, sont encore mal connus.

3.1. La vascularisation osseuse, pilier des fonctions squelettiques

Le squelette est un système en adaptation constante grâce à des signaux de rétrocontrôle déclenchés par des stimuli mécaniques, biochimiques ou nerveux. Le tissu osseux est un tissu composite, aux nombreuses fonctions. Le métabolisme phosphocalcique et l'hématopoïèse, sont de plus en plus décrits comme interdépendants [58]. Pour certaines des fonctions du squelette, la vascularisation osseuse est l'élément liant. De manière générale, la survie cellulaire est conditionnée par la présence à proximité d'un vaisseau, lui procurant l'apport nutritionnel nécessaire [93]. L'altération de cette vascularisation et du flux sanguin, peuvent être impliqués dans de multiples pathologies (nécrose avasculaire, ostéoporose, maladie de Paget ...) [18]. De plus en plus d'études mettent en évidence l'existence d'un lien entre ostéogénèse et angiogénèse, ainsi qu'entre la vascularisation et le remodelage osseux [78]. Il devient alors essentiel de mieux comprendre les relations anatomiques et fonctionnelles entre le tissu osseux et la vascularisation associée. Bien que la vascularisation de nombreux organes ait été explorée et évaluée dans de multiples études, celle de l'os reste encore mal connue, principalement à cause de difficultés de mise en évidence.

3.2. Bases moléculaires des interactions vasculo-osseuses

Les métabolismes osseux et vasculaire, au sein de l'os, sont liés de manière étroite. Ils sont basés sur un dialogue constant entre ces deux compartiments via des facteurs humoraux. La plupart des facteurs ostéogéniques stimulent l'angiogénèse directement ou indirectement, au travers de la production de facteurs angiogéniques (VEGF). Bien que de nombreuses molécules avec une activité, à la fois angiogénique et ostéogénique, aient été identifiées ; leur

rôle dans le dialogue intime entre cellules osseuses, et cellules endothéliales est en cours d'étude [16].

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), est un facteur angiogénique, exprimé antérieurement à la formation des vaisseaux et détecté dans les os de souris en formation [16]. Cette molécule exprimée par les cellules endothéliales, joue un rôle dans l'ostéogénèse via la production accrue de Bone Morphogenic Factor (BMP). De plus, les ostéoblastes expriment et répondent au VEGF, influant ainsi les métabolismes osseux et vasculaire. Les ostéoclastes ne produisent pas de VEGF mais y répondent [16]. Ce facteur joue un rôle non négligeable dans la régulation du recrutement, de la survie et de l'activité des cellules endothéliales, des ostéoblastes et ostéoclastes [16].

D'autres molécules, telles les BMP, l'angiotensine, les endothélines influent sur les métabolismes osseux et vasculaire [18] et sont actuellement en cours d'étude.

3.3. Le vaisseau au centre de l'unité de remodelage osseux [78]

Comme vu précédemment, le tissu osseux est détruit et reformé constamment. Le remodelage osseux du squelette adulte se fait au sein de zones précises du tissu osseux : les BMU (Bone Multicellular Units). La finalité des BMU est de remplacer l'os âgé. De ce fait, tous les ostéoblastes et ostéoclastes appartiennent à une BMU, qui se déplace le long de la surface osseuse. La structure de la BMU fait en sorte que les nouveaux ostéoblastes n'apparaissent qu'au niveau des zones laissées vacantes par les ostéoclastes. Ce processus local est connu sous le nom de « couplage ». Il repose sur deux mécanismes principaux : l'augmentation de la production de nouveaux ostéoblastes et les signaux chimiotactiques qui assurent leur arrivée sur le site rapidement.

Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer le couplage, avec plus ou moins de succès. Une nouvelle proposition a été faite en 2000 par Parfitt : le couplage médié par les vaisseaux. Effectivement, le capillaire possède une position stratégique au sein de la BMU : au centre de cette dernière (figure 14). Il est donc idéalement localisé pour réguler le processus de formation/résorption. De plus, les péricytes et les cellules endothéliales des vaisseaux osseux, expriment des caractères phénotypiques ostéoblastiques, laissant supposer qu'ils pourraient être des précurseurs des ostéoblastes. En outre, les cellules endothéliales sécrètent des molécules influant, plus ou moins directement, l'ostéogénèse (cf. § 3.3).

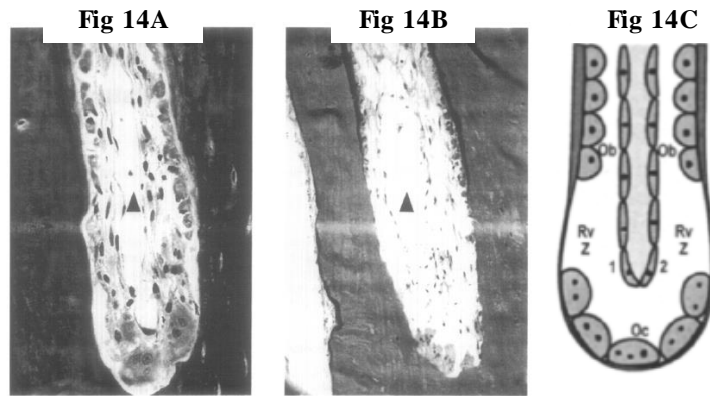


Figure 14 : Capillaires au sein des BMU corticales [78]

Fig 14A: chez le chien

Fig 14B chez l'homme

Fig 14C: vue schématique de la BMU

Chaque BMU contient un capillaire central.

3.4. Rôle de la vascularisation dans la réparation / cicatrisation osseuse

Lors de lésion d'un tissu mou, la cicatrisation de la plaie aboutit à une cicatrice fibreuse. A l'inverse, l'os est unique dans sa capacité de régénération sans cicatrice [16]. La réparation de fractures via la génération d'un cal osseux se produit en quatre étapes. Suite à l'altération du réseau vasculaire, la cascade de coagulation se met en place, et aboutit à la formation d'un hématome (figure 15a). Cet hématome est pourvu d'une activité angiogénique [16]. La réponse inflammatoire participe à l'angiogénèse et produit de nombreux facteurs de croissances et cytokines ayant des rôles distincts dans la réparation osseuse [16]. Le tissu de granulation formé est progressivement remplacé par un tissu fibrocartilagineux (cal interne) (figure 15b), alors que le périoste forme directement de l'os (cal externe) (figure 15c). Le cal interne va se minéraliser. Lors de la phase de remodelage (figure 15d), le cal osseux est remplacé par un tissu osseux lamellaire secondaire, et l'apport vasculaire régresse. Au cours de la cicatrisation, les composants de l'apport vasculaire osseux s'ajustent par rapport aux besoins physiologiques du site [16]. L'angiogénèse osseuse est donc couplée de près à l'ostéogénèse lors de la réparation de dommages osseux (fracture, avulsions).

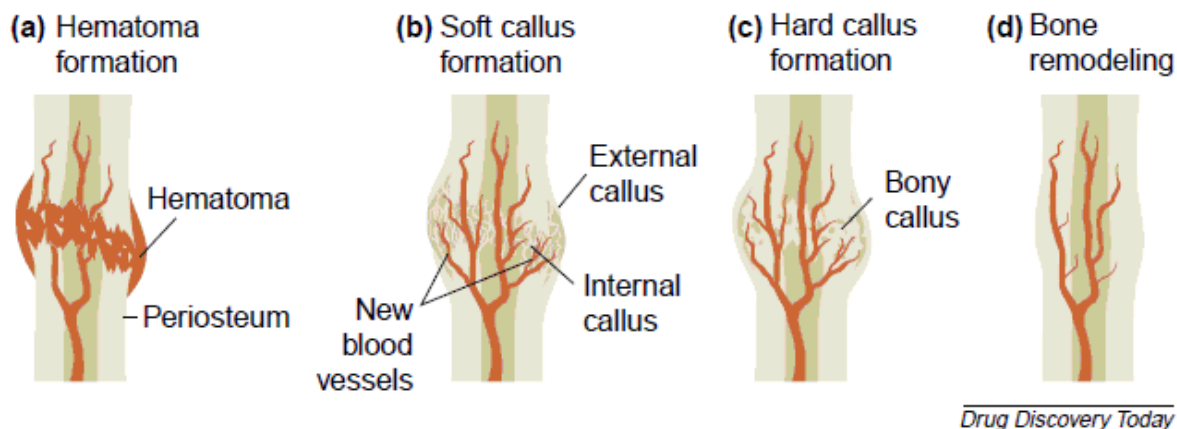


Figure 15 : Étapes de cicatrisation osseuse suite à une fracture [16]

- a : Formation de l'hématome : suite à la blessure, l'éclatement des vaisseaux mène à la formation de l'hématome
 b : Formation du callus mou : formation de nouveaux vaisseaux (angiogénèse). Le callus externe procède d'une ossification de membrane. Le callus interne est formé de fibrocartilage.
 c : Formation du callus dur : minéralisation du callus
 d : Remodelage osseux : le callus est remplacé par de l'os lamellaire et l'apport vasculaire revient à la normale.

3.5. Le vaisseau osseux au centre des niches de cellules souches hématopoïétiques

3.5.1. Les niches de cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches assurent le renouvellement et l'homéostasie des tissus de l'organisme [80]. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) assurent la production quotidienne de plus de 500 milliards de cellules sanguines [3]. Les CSH sont des cellules multipotentes, qui assurent la production de cellules différenciées et leur propre renouvellement. Elles possèdent également la capacité de rester quiescentes [3, 83].

La niche désigne un site anatomique et fonctionnel, contenant un ensemble de cellules souches entrant en division ou restant quiescentes. L'activation de ces cellules, ou leur maintien en quiescence, se fait en réponse à des signaux provenant du microenvironnement immédiat que constitue la niche [83]. Cette dernière assure donc la maintenance et la régulation des fonctions de ces cellules [83]. Les cellules souches hématopoïétiques ont leur propre niche spécifique située au sein des cavités médullaire de l'os trabéculaire chez l'adulte [3, 43, 83].

Malgré 30 ans de recherche, la localisation et la structure des niches CSH restent imprécises. Des études ont été faites pour les mettre en évidence, via des marqueurs phénotypiques. Alors que certaines équipes ont montré la présence de CSH juxta osseuses

(théorie de la niche ostéoblastique), d'autres ont mis évidence des CSH à proximité ou au contact de l'épithélium sinusoidal (théorie de la niche vasculaire) [34, 95]. La question de la dualité de la niche hématopoïétique ostéoblastique et vasculaire ou de son unicité n'est actuellement pas tranchée [34, 83].

3.5.2. Relations spatiales et fonctionnelles entre les CSH, les cellules osseuses et la vascularisation

3.5.2.1. La niche endostéale ou ostéoblastique

Comme évoqué précédemment, à l'âge adulte, l'hématopoïèse a lieu uniquement dans l'os. Cela fait donc un certain temps qu'un lien est supposé entre la formation des cellules sanguines et les caractéristiques uniques de l'os. Il est désormais presque certain, que l'os, ou des composants spécifiques de la cavité médullaire, définissent l'emplacement des niches CSH. La lignée ostéoblastique se compose de cellules plus ou moins matures : les cellules souches mésenchymateuses, les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes et les ostéocytes (du plus primitif au plus différencié) [82, 98].

Des études ont montré la capacité des lignées ostéoblastiques à supporter les cellules hématopoïétiques dans des cultures *ex vivo* [82]. D'autres études ont mis en évidence, une corrélation entre le nombre d'ostéoblastes et le nombre de CSH [82]. En cas de diminution du nombre d'ostéoblastes et de CSH, une augmentation de l'hématopoïèse extra-médullaire a été observée [82]. Par ailleurs, de multiples études ont démontré que les molécules, exprimées par les ostéoblastes, pouvaient réguler de manière positive ou négative l'activité des CSH [40].

En outre, les ostéoblastes jouent un rôle actif dans la régulation de la granulopoïèse et de la lymphopoïèse des lymphocytes B [43]. Ils sont aussi capables d'induire la différenciation des CSH en ostéoblastes [98].

Certaines études ont noté que la niche ostéoblastique est une niche contenant des CSH quiescentes. A ce jour, au moins trois molécules (N-cadhérine, angioprotéine-1 et thrombopoïétine) retrouvées à la surface des ostéoblastes ont montré une capacité à réguler la quiescence des CSH via des interactions avec leurs récepteurs [43, 82, 95, 98].

3.5.2.2. La niche vasculaire

Au sein de la moelle osseuse, les capillaires sinusoides forment une barrière entre les cellules hématopoïétiques en développement et le sang. Ils sont, par conséquent, le site initial d'entrée de toutes les cellules sanguines dans la moelle osseuse et le lieu final où les cellules sanguines, néoformées dans la moelle, passent dans la circulation sanguine [82].

Les cellules souches hématopoïétiques et les cellules endothéliales sont dérivées d'un progéniteur commun : les hémangioblastes. En conséquence, elles expriment des marqueurs communs : CD31, CD34, Flk1 (récepteur au VEGF)... [98]. Les interactions entre cellules endothéliales et CSH ont été bien étudiées lors du développement de l'hématopoïèse embryonnaire, néanmoins leur lien chez l'adulte n'est pas évident [98].

La possibilité d'une zone périvasculaire faisant fonction de niche régulatrice pour les CSH est issue de deux études. Ces dernières, mettent en évidence une majorité de cellules souches présentes autour des vaisseaux [56, 82].

Toutefois, il faut garder à l'esprit que le vaisseau est une zone de transit majeur pour les CSH. Cela pourrait expliquer leur présence en grande quantité dans la zone périvasculaire [56, 82]. De plus, contrairement aux cellules ostéoblastiques, aucune étude n'a prouvé qu'une atteinte de la fonction endothéliale puisse affecter les CSH.

Malgré tout, des études *in vitro* ont montré la capacité des cellules endothéliales à supporter, *in vitro*, la culture de CSH [82].

Contrairement à la niche endostéale, la niche vasculaire a été proposée comme étant un site de différenciation où les CSH seraient plus actives [82, 95, 98]. L'activité accrue des cellules souches dans cette zone pourrait s'expliquer par un apport en oxygène et nutriments plus important que pour la niche endostéale [98].

De récentes études ont soulevé la possibilité que la partie vasculaire des niches pourrait ne pas être limitée aux sinusoides. Les niches pourraient être composées d'un sinusoides veineux et d'un capillaire artériel (figure 16). Cette hypothèse nécessite des investigations plus poussées basées sur un développement de l'imagerie et la mise au point de souris transgéniques [95].

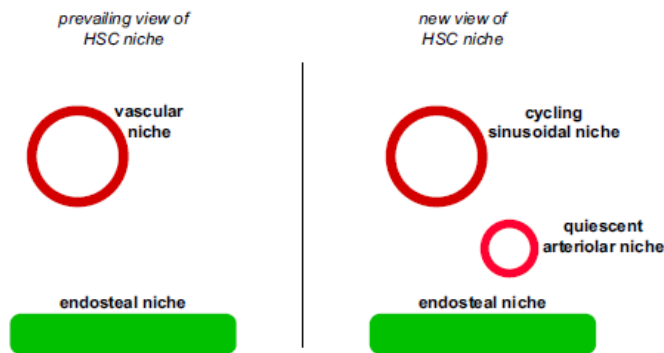


Figure 16 : Niches hématopoïétiques : ancienne et nouvelle visions de leur organisation [95]

3.5.2.3. Une seule niche ?

Les études portant sur la localisation des CSH dans leur niche, sont principalement basées sur des coupes de moelle osseuse. Le principal inconvénient de ces sections est qu'il s'agit de représentations bidimensionnelles de structures tridimensionnelles. Dès lors, l'interprétation peut être faussée, se focalisant sur un seul type cellulaire bien que la niche se compose sûrement de plusieurs types. Il est, par exemple, fort probable que les niches endostéale et vasculaire soient en étroite relation, voire ne constituent qu'une seule niche [82].

Récemment, il a été mis en évidence un lien spatial très étroit entre les niches endostéale et vasculaire [34], suggérant que les deux niches ne sont pas exclusives.

En outre, de récentes études montrent que l'apparition de cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse requiert d'abord l'assemblage de sinusoides dans un procédé qui est en partie contrôlé par des molécules ostéoprogénitrices [43, 90, 95].

Il est alors possible que les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les CSH interagissent à travers une combinaison de facteurs cellulaires et solubles pour créer des niches qui supportent la division et la différenciation des CSH [43].

4. TECHNIQUES D'EXPLORATION DU RESEAU VASCULAIRE OSSEUX

La mise en évidence des effets délétères de l'irradiation sur le réseau microvasculaire, nécessite de pouvoir observer et quantifier l'anatomie vasculaire et sa fonction (flux sanguin). De nombreuses techniques existent, présentant chacune des avantages et des inconvénients. Il n'existe pas de technique idéale. Les méthodes de quantification vasculaire ne permettent pas d'évaluer la fonction circulatoire, alors que les techniques d'évaluation de la fonction vasculaire ne présentent pas une résolution suffisante pour quantifier le réseau microvasculaire. L'association de deux techniques s'avère donc nécessaire pour l'exploration complète de l'anatomie et de la fonction vasculaire.

4.1. Techniques de quantification de la microvascularisation

L'identification des structures vasculaires, étape préalable à leur évaluation quantitative, procède soit d'un marquage des constituants de leur paroi (Immunohistochimie (IHC), microscopie confocale), soit du remplissage de leur lumière par un produit contrastant (microangiographie, microscopie électronique, μ CT, SR μ CT). Les techniques histologiques se font par coloration des constituants du tissu ou par remplissage vasculaire.

4.1.1. Microangiographie

La microangiographie est une technique d'étude de la vascularisation, par remplissage du lit vasculaire avec un produit radio-opaque (sulfate de Baryum pour l'étude des vaisseaux osseux) [7, 9]. Cette technique exige le sacrifice du sujet, puis le prélèvement de l'os étudié. Après la fixation de l'échantillon, des coupes de 3 mm à 150 μ m d'épaisseur sont réalisées dans le plan d'intérêt, affinées (de 100 μ m à 1 μ m), puis radiographiées [7, 9].

Cette technique permet une bonne visualisation des vaisseaux osseux à l'échelle microscopique et de leurs relations avec l'os trabéculaire environnant (figure 17). Néanmoins, les données obtenues sont uniquement en deux dimensions, une partie des informations est donc omise. De plus, la méthode nécessite le repérage visuel et le compte des vaisseaux par un observateur humain. Le travail de quantification sur un grand nombre d'échantillon est donc laborieux et nécessite d'être réalisé au moins deux fois par deux observateurs indépendants afin de minimiser le risque de biais [31, 53].

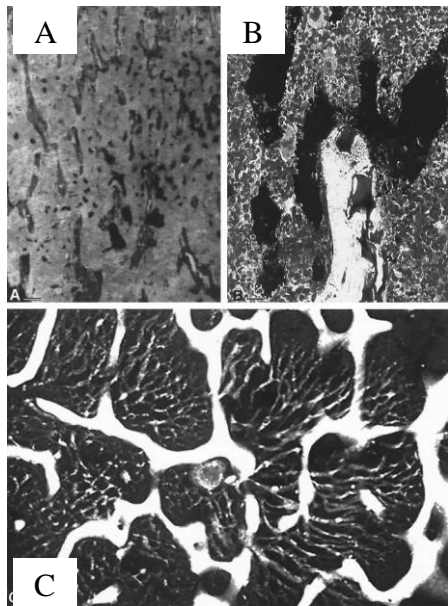


Figure 17 : Réseau vasculaire au sein de l'os trabéculaire (microangiographie) [7]

Images A et B : Les vaisseaux ont été injectés avec de l'encre d'Inde au niveau de la métaphyse tibiale. Sections de 7 μ m d'épaisseur.

A : coloration au trichrome de Goldner
grossissement x100 / barre d'échelle = 100 μ m

B : coloration au bleu de Toluidine
grossissement x250 / barre d'échelle = 40 μ m

Image C : les vaisseaux ont été injectés avec du sulfate de baryum au niveau de la métaphyse tibiale. Microradiographies de 100 μ m d'épaisseur. grossissement x100 / barre d'échelle = 100 μ m

4.1.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse du réseau vasculaire au microscope électronique à balayage peut se faire selon deux techniques différentes qui nécessitent un remplissage du lit des vaisseaux.

Dans le premier cas, un produit radio opaque (comme le sulfate de Baryum) est injecté suite au sacrifice de l'animal. Après prélèvement et inclusion de la pièce osseuse dans un bloc de résine, ce dernier est coupé au niveau de la zone d'intérêt. Il est ensuite poli finement et métallisé au carbone.

L'analyse au MEB permet de mettre en évidence l'os et le produit radio opaque. Les rapports entre vascularisation et os peuvent par conséquent être étudiés (figure 18). Le très fort grossissement du MEB permet de valider les données acquises au travers d'autres méthodes (micro-scanner par exemple). Il s'agit néanmoins d'une analyse bidimensionnelle.

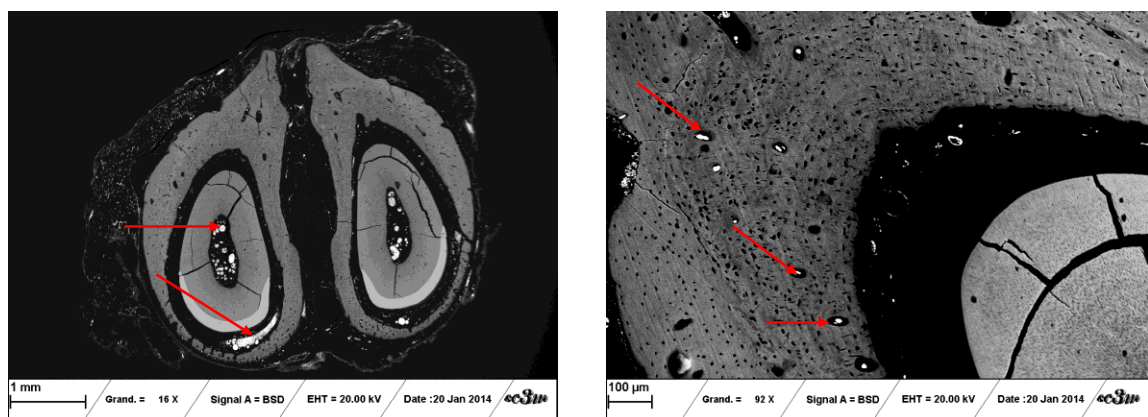


Figure 18 : Mise en évidence de la vascularisation osseuse d'une mandibule de rat (MEB) [LIOAD]

Dans la deuxième méthode, une résine plastique basse viscosité (pour pénétrer les capillaires) est injectée dans la circulation afin de remplir l'intégralité du lit vasculaire. Après polymérisation de la résine, les tissus environnants sont corrodés afin d'obtenir une réplique du réseau vasculaire en polymère. Cette réplique est ensuite observée avec un microscope électronique à balayage (MEB). Il s'agit donc d'une technique de moulage vasculaire par corrosion (VCC : Vascular Corrosion Casts) [46, 77].

Cette méthode nous apporte des informations détaillées concernant l'organisation du lit vasculaire de nombreux organes jusqu'au niveau microscopique (figure 19). Il a été prouvé que le polymère remplissait l'intégralité du lit vasculaire (capillaires et sinusoides compris) [46]. En outre, l'utilisation d'un agent corrosif doux conserve la surface du polymère intacte. Les caractéristiques des cellules endothéliales sont imprimées sur cette surface et donnent des indications sur le type de vaisseau dont il s'agissait [46].

Cependant, les capacités quantitatives du MEB sont limitées de par le fait que seuls les vaisseaux superficiels exposés aux électrons sont visibles [9]. La microscopie électronique ne permet qu'une pseudo image en trois dimensions [93]. Sans oublier que la technique nécessite la corrosion des tissus organiques et en conséquence ne permet pas d'étudier la relation entre la vascularisation et le tissu osseux [7].

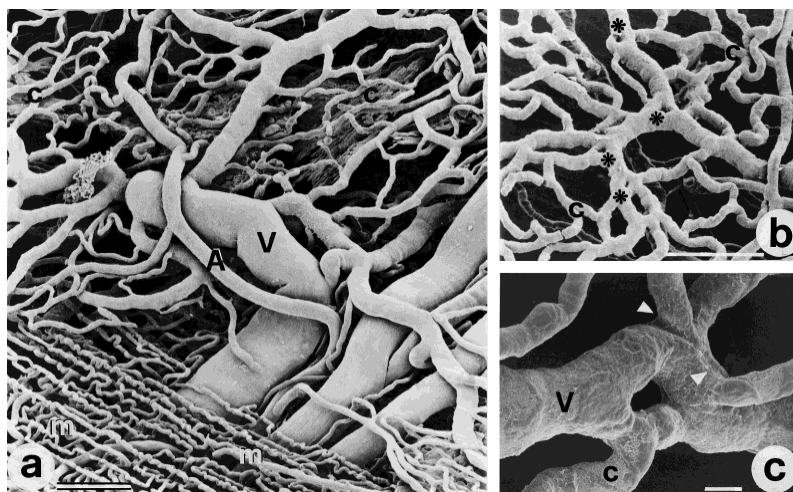


Figure 19 : Vascularisation des os plats (moulage vasculaire par corrosion et MEB) [77]

a : barre d'échelle = 100 μm
 b : barre d'échelle = 100 μm
 c : barre d'échelle = 10 μm

Dans un cas comme dans l'autre, le MEB permet la gamme la plus large d'agrandissements et une forte résolution [9].

4.1.3. Microscopie optique

4.1.3.1. Histologie

La mise en évidence de la vascularisation en microscopie optique se fait par injection d'un produit contrastant dans le réseau vasculaire (encre d'Inde, silicone, sulfate de baryum). Les coupes réalisées sont ensuite traitées avec des agents de coloration histologiques (pentachrome de MOVAT (figure 20B) ou coloration hématoxyline et éosine (figure 20A)). Les coupes sont ensuite observées avec un microscope optique. Les contours des vaisseaux sont délimités par l'observateur et comptés [9].

Cette méthode permet l'évaluation de la densité vasculaire, mais il s'agit d'une méthode subjective (observateur-dépendante), en deux dimensions, qui n'est pas forcément représentative de la vascularisation dans l'intégralité de l'échantillon [31].

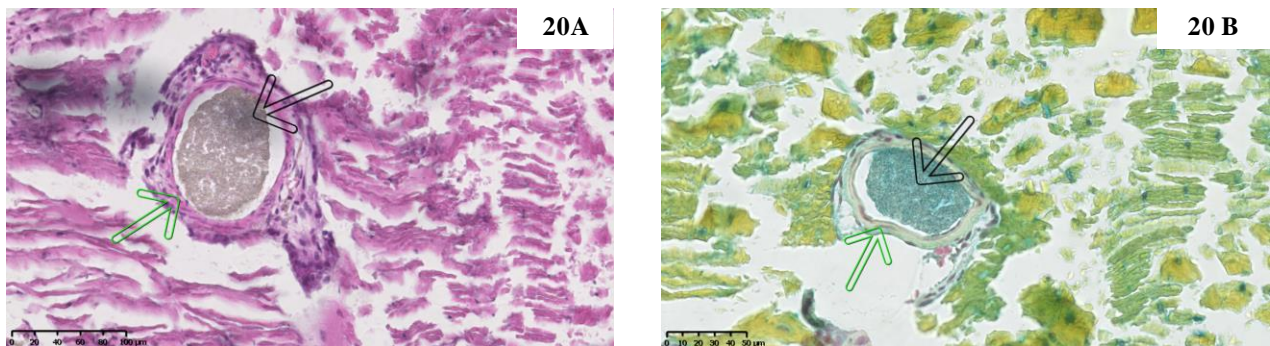


Figure 20 : Vaisseaux osseux mandibulaires (coupes histologiques chez le rat) [LIOAD]

20 A : coloration Hématoxyline-Eosine

20 B : coloration MOVAT

Flèches noires : sulfate de Baryum

Flèches vertes : paroi endothéliale

4.1.3.2. Immunohistochimie (IHC)

L'IHC repose sur la localisation de protéines dans les cellules d'une coupe d'un tissu par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Cette méthode exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à un antigène, permettant de mettre en évidence un type cellulaire spécifique. Dans le cadre de l'étude des vaisseaux, des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses sont ciblées [87]. Le marquage des cellules endothéliales dans l'os relève essentiellement du facteur Von Willebrand, de CD31 (figure 21), VEGFR3, CD34 et Endomucine. Le marquage des cellules musculaire lisses (CMS) par

l' α -SMA, couramment utilisé pour l'IHC vasculaire dans les autres tissus, n'est pas habituellement utilisé dans l'os [4, 87].

Bien qu'automatisée, la quantification des vaisseaux nécessite le repérage visuel et le surlignage des contours vasculaires [84]. Cette méthode permet la validation qualitative des données obtenue avec le micro-scanner [32, 112].

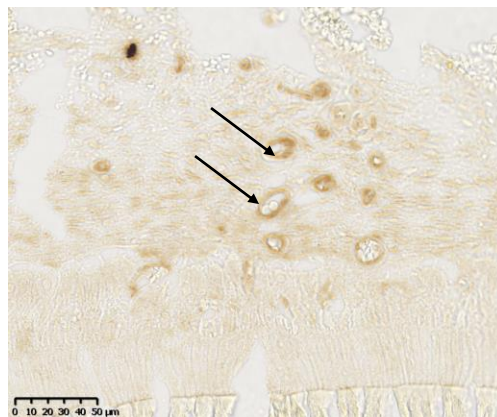


Figure 21 : Mise en évidence de la vascularisation osseuse par marquage CD31 de la paroi endothéliale [LLOAD]

(coupe résine de mandibule de rat non décalcifiée)

4.1.4. Micro Computed Tomography (μ CT)

4.1.4.1. Définition

La tomographie définit une technique qui permet de reconstruire le volume d'un objet à partir d'une série de mesures effectuées par tranche depuis l'extérieur du sujet (figure 22). La micro tomographie est donc une technique de micro imagerie en trois dimensions non destructive, exploitant les propriétés des rayons X afin d'explorer une structure. Suite à l'acquisition des données (coupes), un algorithme est appliqué par le logiciel pour reconstruire une vue 3D de la structure d'intérêt (figures 22 et 23) [112].

4.1.4.2. Principe

Le principe de base consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus, puis par traitement informatique, à numériser les données sous forme de coupes et enfin à reconstruire des images en deux ou trois dimensions de la structure d'intérêt [112].

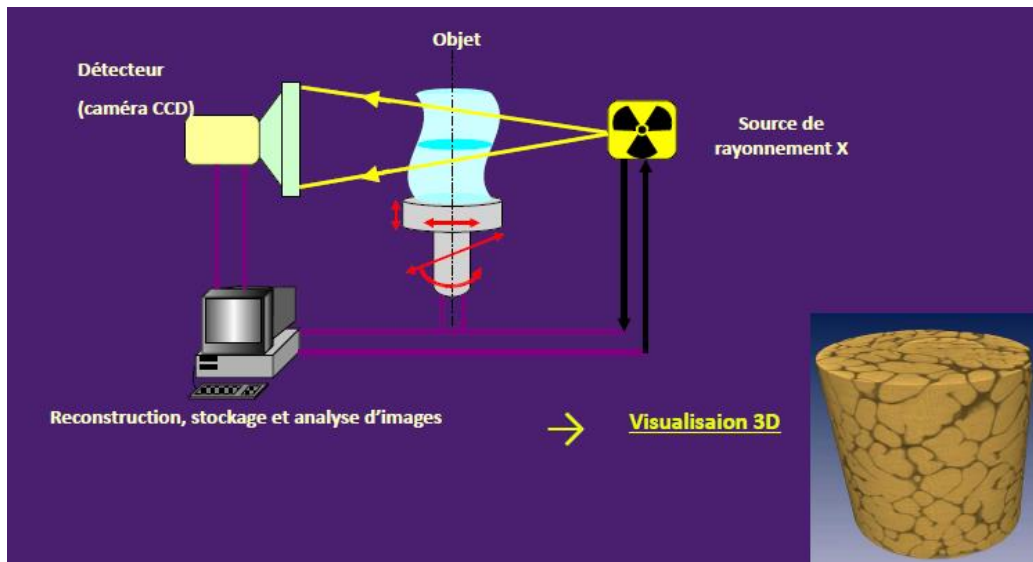


Figure 22 : Principe de la microtomographie par rayons X [113]

La rotation de l'échantillon permet l'analyse de l'échantillon sous différents angles et sa reconstruction 3D

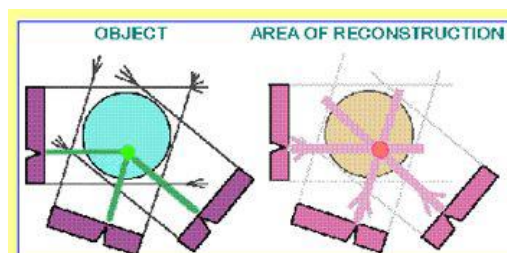


Figure 23 : Principe de la microtomographie par rayons X [113]

Chaque point de l'image projetée contient les informations d'absorption des RX (densité) de l'échantillon 3D
Plusieurs projections aux rayons X (radiographies) sont prises sous angles différents de 0 à 180°

4.1.4.3. Paramètres influant la qualité de l'image

Le μ CT permet par l'utilisation d'algorithmes et l'informatisation des données une analyse quantitative et reproductible de la structure vasculaire. La précision et la qualité des données obtenues dépendent principalement de différents facteurs : la géométrie du scanner, la source de rayons X et le détecteur en ce qui concerne le matériel ainsi que la taille des voxels et le seuillage pour les réglages [31].

La taille des voxels va déterminer la résolution de l'image finale (figure 24), et donc sa capacité à détecter les structures les plus petites (capillaires). Néanmoins, il faut prendre en compte que plus la taille de voxels sélectionnée est petite plus le temps d'acquisition est long [31].

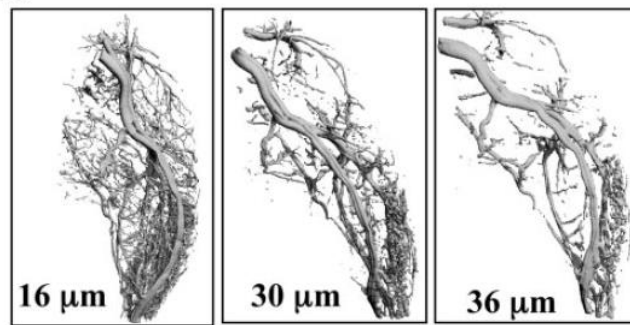


Figure 24 : Influence du choix de la taille des voxels [31]

L'autre paramètre déterminant est le seuillage (figure 25). L'échantillon analysé est reconstruit par des voxels d'intensité de gris variable. L'opérateur va devoir choisir un seuil de détection en dessous duquel les voxels ne seront pas pris en considération. En ce qui concerne les vaisseaux, si le seuillage est élevé, l'image obtenue sera proche de la réalité concernant les gros vaisseaux, mais les capillaires seront omis. A l'inverse, un seuillage bas permettra de voir les petites structures capillaires, mais les vaisseaux plus importants apparaîtront artificiellement plus larges qu'ils ne le sont en réalité [31, 39, 53, 112]. Il est donc nécessaire de choisir un seuil optimal pour l'analyse de l'ensemble de l'arbre vasculaire ou bien il faut réaliser deux analyses à des seuils différents, une pour les gros vaisseaux et une autre pour les capillaires [31, 39].

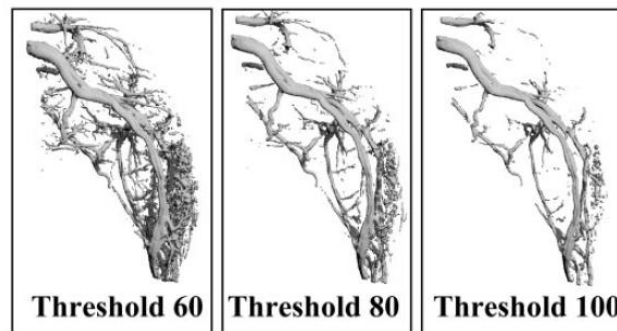


Figure 25 : Influence du seuillage [31]

La sélection d'une taille de voxel appropriée et le choix d'un seuillage optimal sont des critères essentiels affectant la fidélité de la quantification des paramètres morphométriques vasculaires [53]. En fonction des structures étudiées et de la vue souhaitée (globale vs très détaillée), la valeur de seuillage sera différente. Néanmoins, il importe, au début de l'étude, de définir le seuillage optimal et de conserver cette valeur tout au long du travail de recherche [31].

4.1.4.4. Paramètres d'analyse de la micro vascularisation

Exploité dans un premier temps pour l'étude de la microarchitecture osseuse [74], l'application du μ CT pour la microvascularisation en a découlé [74], permettant une quantification du réseau microvasculaire [3, 4, 31, 39, 64, 93, 110, 112].

La structure de la microvascularisation est très complexe. A ce jour il existe très peu (s'il en existe) de logiciels de quantification 3D des images vasculaires issues du μ CT [112].

De nouvelles méthodes ainsi que des définitions claires de ce qui a besoin d'être quantifié doivent être développées. Aujourd'hui les paramètres d'analyse ainsi que les algorithmes de reconstruction et de quantification de la vascularisation sont dérivés des paramètres morphométriques de la microarchitecture osseuse trabéculaire [31].

Seront donc pris en compte le volume vasculaire, la connexion des vaisseaux entre eux, leur nombre, leur diamètre, ainsi que leur degré de séparation. [31, 53, 112].

4.1.4.5. Produits de contraste

L'analyse μ CT repose sur l'absorption des rayons X par les tissus. Or, si la technique se prête bien à l'étude de la microarchitecture trabéculaire, les vaisseaux ne présentent pas un coefficient d'atténuation suffisant pour se distinguer du reste des tissus environnants. La visualisation et la quantification des structures vasculaires en trois dimensions nécessitent par conséquent, l'injection dans le réseau vasculaire, d'un produit de contraste [31, 71, 112].

Ce produit doit répondre à un cahier des charges (*ex vivo*):

- Produit stable et homogène
- Haute radio-opacité
- Pas d'extravasation
- Viscosité suffisamment faible pour permettre au produit de pénétrer l'ensemble du réseau vasculaire (capillaires et sinusoides compris)
- Facilité de manipulation et d'injection
- Rétrécissement moyen limité pour ne pas déformer les vaisseaux et fausser les données
- Facilement visible sur les coupes histologiques (non obligatoire mais souhaitable pour valider les données obtenues avec le μ CT)
- Si non visible au microscope, addition d'un colorant inerte

Le choix de l'agent de contraste détermine en grande partie la qualité des données obtenues. Les deux produits les plus utilisés actuellement sont le Microfil® et le sulfate de baryum. Ces deux produits remplacent le sang et sont donc des agents de contraste pour analyses *ex-vivo*. Le Microfil® est un polymère radio-opaque qui nécessite la décalcification de l'os pour l'analyse μ CT [31, 39]. Le sulfate de baryum est une solution de particules insolubles dans l'eau avec un numéro atomique élevé, bien visible sur les coupes histologiques [39, 112]. Le sulfate de baryum est mélangé avec une solution de gélatine afin de permettre sa prise. Il est donc injecté chaud et fluide, avant d'être refroidi pour provoquer la prise [39, 113]. Le choix de l'agent de contraste varie en fonction des équipes, certains obtiennent de meilleurs résultats avec le Microfil® [3, 4, 31, 110], d'autres préféreront le sulfate de baryum [31, 39, 64, 93]. La facilité d'injection et l'homogénéité du produit dans les vaisseaux sont des facteurs déterminants pour le choix du produit.

4.1.4.6. Avantages et limites

Le microscanner présente de multiples avantages par rapport aux techniques suscitées. D'une part, l'échantillon peut être analysé dans son intégralité sans aucune altération. D'autre part, la reconstruction en trois dimensions donne une vue globale et détaillée de la vascularisation dans l'ensemble de l'échantillon. Mais le principal avantage de la technique est qu'elle permet une analyse quantitative et reproductible à très forte résolution (jusqu'à 1 μ m) [4, 9, 26, 31, 32, 39, 53, 71, 110, 112].

Comme vu précédemment, plus la définition est forte, plus le temps d'acquisition est long. Les études *ex vivo* ne sont pas limitées par la durée d'anesthésie du sujet et permettent donc d'obtenir une meilleure résolution [9]. En revanche, le sacrifice animal exclu la possibilité de réaliser des études longitudinales [31].

La principale limite du microscanner est qu'il n'existe pas encore de logiciel proprement dédié à la quantification de la vascularisation [112]. De plus cette méthode est également limitée par les propriétés de l'agent de contraste injecté [9, 112].

La réussite d'une procédure de μ CT requiert exigence et précision à chaque étape [112].

4.1.5. Synchrotron Micro Computed Tomography (SR μ CT)

Le terme synchrotron désigne un grand instrument électromagnétique destiné à l'accélération à haute énergie de particules élémentaires, aboutissant à la production d'un rayonnement monochromatique de haute énergie, avec une forte cohérence spatiale et temporelle.

La seule différence entre le SR μ CT et le μ CT est donc la source de rayons X (source polychromatique moins cohérente pour le μ CT) [9].

Les propriétés uniques des rayons X produits par le synchrotron permettent en conséquence d'obtenir une image d'une très forte résolution ($<1\ \mu\text{m}$) avec un très fort rapport signal/bruit facilitant donc le seuillage et la mise en évidence des structures d'intérêt (figure 27). De plus, ces rayons X permettent de diminuer les artéfacts dus au durcissement des rayons [9].

Néanmoins, l'utilisation de cette technique est limitée par le fait que les synchrotrons sont des structures très importantes et que leur disponibilité est donc limitée. A ce jour, il existe deux synchrotrons en France, un à Grenoble (ESRF, figure 26) et un à St Aubin dans l'Essonne (SOLEIL). En outre, la technique requiert une importante maîtrise technique pour le recueil et l'analyse des données, et ne permet d'observer qu'une petite zone d'intérêt [9]. Ses autres caractéristiques (avantages et inconvénients) sont les mêmes que le μ CT : visualisation 3D, os et vaisseaux observables en même temps, etc. ...



Figure 26 : European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) Grenoble [33]

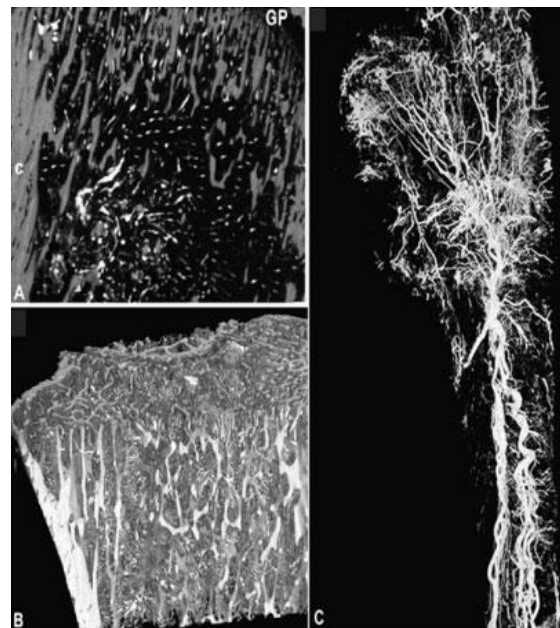


Figure 27 : La vascularisation tibiale (SR μ CT) [39]

A et B : tibia non décalcifiés, C : tibia décalcifié

Figure 28 : TABLEAU RESUME DES TECHNIQUES D'ANALYSE DE L'ANATOMIE VASCULAIRE OSSEUSE

	In vivo/ in vitro	Visualisation os ET vaisseaux	2D/3D	Avantages	Limites
Microangiographie	In vitro	Oui	2D	- forte résolution - possibilité de visualiser os et vaisseaux en même temps.	- 2D - uniquement anatomique - sacrifice animal - résultats observateur-dépendants > nécessité d'avoir deux observateurs au moins - ne permet pas de distinguer quel type de vaisseau est mis en évidence (artériel ou veineux) - long - demande technicité
MEB	In vitro	Oui	2D	- résolution forte (2µm) - validation données µCT - possibilité de visualiser os et vaisseaux en même temps	- 2D - uniquement anatomique - sacrifice animal - ne permet pas de distinguer quel type de vaisseau est mis en évidence (artériel ou veineux)
MEB (VCC)	In vitro	Non	2D Pseudo 3D	- résolution forte (2µm) - différenciation des vaisseaux possible (artère ou veine)	- 2D - uniquement anatomique - sacrifice animal - destruction de l'os - seuls les vaisseaux superficiels sont observés - non quantitatif sur l'ensemble du réseau vasculaire - résultats observateur-dépendants > nécessité d'avoir deux observateurs au moins
Histologie	In vitro	Oui	2D	- forte résolution - possibilité de visualiser os et vaisseaux en même temps	- 2D - uniquement anatomique - sacrifice animal
IHC	In vitro	Non	2D	- forte résolution - validation des données µCT - mise en évidence claire de la structure d'intérêt	- résultats observateur-dépendants > nécessité d'avoir deux observateurs au moins

<p>μCT</p>	<p>In vivo et in vitro</p>	<p>Oui</p>	<p>2D et 3D</p>	<ul style="list-style-type: none"> - forte résolution (1μm) - reproductibilité - facilité d'utilisation - adapté aux analyses haut débit - 3D - quantitatif et automatique (via algorithmes) - possibilité d'observer les os et les vaisseaux en même temps - conservation de l'échantillon intact 	<ul style="list-style-type: none"> - uniquement anatomique - forte exposition aux radiations ionisantes (pose problème pour l'<i>in vivo</i>) - nécessité sacrifice animal (<i>in vitro</i>) pour obtenir la meilleure résolution > pas d'étude longitudinale possible. - cout matériel (investissement) - limité par propriétés de l'agent de contraste - absence d'outils logiciels adaptés - possibilité qu'il existe des vaisseaux avec un diamètre intraluminal inférieur à la résolution du μCT. - temps d'acquisition long - matériel très onéreux
<p>SRμCT</p>	<p>in vitro</p>	<p>Oui</p>	<p>3D</p>	<ul style="list-style-type: none"> - très forte résolution (< 1μm) - ratio signal/bruit très élevé - pas d'artefact de beamhardening - sinon idem μCT 	<ul style="list-style-type: none"> - disponibilité faible - volume de tissu étudié petit - compétences techniques importantes nécessaires pour le recueil et l'analyse de données - études in vivo impossibles du fait de la très forte dose de radiations à laquelle est exposé l'échantillon - sinon idem μCT

4.2. Exploration de la fonction vasculaire

Il s'agit de mesurer le flux sanguin dans l'os. Le choix de la technique dépend principalement du champ d'étude et du modèle animal [87].

4.2.1. Laser Doppler

La mesure de flux par laser doppler exploite les propriétés de la lumière afin d'évaluer le flux d'hématies dans un lit microcirculatoire (figure 29). L'amplitude de l'effet Doppler dépend du flux d'hématies [65]. La méthode est non invasive et les données semi-quantitatives permettent essentiellement une analyse fonctionnelle. Elle ne permet pas d'obtenir d'informations anatomiques (sa résolution maximum est de 50 μm [111]) et est limitée par le fait que seul le flux sanguin superficiel peut être évalué [31].

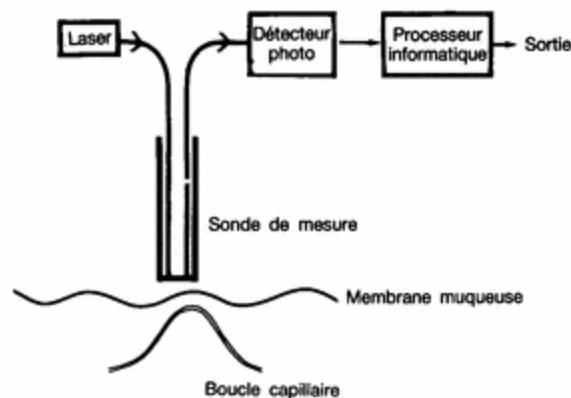


Figure 29 : Représentation schématique de l'équipement laser doppler [87]

4.2.2. Méthodes basées sur la cinétique des traceurs

Il s'agit de méthodes invasives où est observée la cinétique de diffusion de molécules entre le compartiment osseux et le compartiment vasculaire. Il pourra s'agir de molécules diffusant librement de l'os vers les vaisseaux ou de molécules présentant une forte affinité pour l'os. Dans le dernier cas, la clairance de la molécule du compartiment vasculaire vers le compartiment osseux est mesurée [87].

4.2.3. Blocage artériolaire de microsphères

L'injection de microsphères marquées constitue la technique de référence des physiologistes en matière de mesure du flux sanguin. Des microsphères, sont injectées dans la circulation générale, puis un rapport est établi entre la quantité de sphères injectées et la quantité bloquée dans les capillaires. Les microsphères doivent être assez petites pour atteindre les capillaires, mais suffisamment grosses pour être arrêtées lors de leur premier passage. Cependant, cette technique nécessite le sacrifice des animaux pour le recueil de données. En outre, pour les études chez le petit animal comme le rat ou la souris, cette méthode nécessite un haut niveau de compétences en chirurgie vétérinaire [87].

4.2.4. Microscopie intravitale

La microscopie intravitale est un type de microscopie réalisée sur un organisme vivant, permettant d'observer directement des phénomènes dynamiques à une résolution suffisante pour voir les composants cellulaires et subcellulaires. Avec cette méthode, les processus cellulaires dynamiques sont visibles dans leur environnement naturel en temps réel.

Le recours à des traceurs fluorescents permet de réaliser des observations par microscopie confocale (figure 30). Dans le cadre de l'évaluation de la perfusion sanguine osseuse, les mesures se font en évaluant la vitesse de déplacement des hématies, ce qui permet théoriquement une estimation de la perfusion [87]. La méthode nécessite néanmoins de s'affranchir de l'os cortical pour observer la perfusion médullaire osseuse. Cela se fera en réduisant chirurgicalement l'épaisseur de l'os cortical [87]. Il s'agit donc d'une technique invasive.

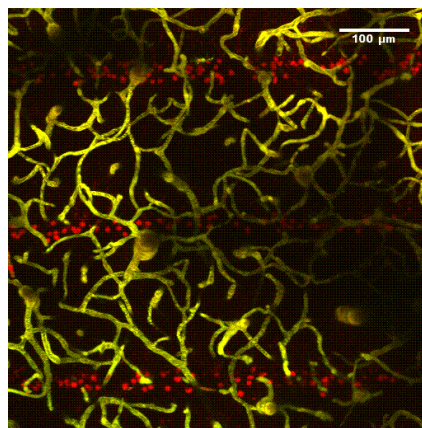


Figure 30 : Vascularisation d'un cortex de souris (microscopie intravitale) [104]

4.2.5. Imagerie par résonance magnétique et Tomographie par émission de positrons (IRM et TEP)

Ces techniques permettent une estimation du flux sanguin par le suivi de l'évolution temporelle du signal lié à l'injection de gadolinium (IRM) ou de 18F-déoxyglucose (TEP). L'avantage principal de ces techniques est qu'elles sont non invasives et ne nécessitent pas une exposition à des radiations ionisantes [9]. Le caractère dynamique de l'exploration implique un compromis entre la résolution spatiale et temporelle, ce qui constitue, dans l'état actuel du développement technique, une limitation à l'exploration chez le petit animal. La résolution spatiale en mesure dynamique est actuellement de l'ordre de 2mm, ce qui exclut l'exploration sur un os de souris [31, 87].

5. CONSEQUENCES DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES TISSUS SAINS

Dans le cadre des cancers des VADS, le traitement de première intention préconisé est la chirurgie et/ou la radiothérapie (associées ou non à la chimiothérapie) [49]. Le choix des modalités thérapeutiques précises dépend de multiples facteurs, dont le type de tumeur, sa taille, sa localisation [49]. Lors d'un traitement par radiothérapie, les zones irradiées sont la tumeur et/ou les aires ganglionnaires cervicales [49].

Si la radiothérapie est réalisée comme traitement principal (sans chirurgie), une dose de 65 à 70 Gray est délivrée en 6.5 à 7 semaines, à raison d'une séance par jour, 5 jours par semaine. Des schémas de fractionnement modifiés sont parfois réalisés [49].

Si la radiothérapie a lieu en complément d'une ablation chirurgicale de la tumeur, une dose de 50 à 65 Gray est délivrée en 5 à 6.5 semaines, à raison d'une séance par jour, 5 jours par semaine. Dans ce cas, la radiothérapie devra débuter au plus tard 7 semaines après la chirurgie [49].

5.1. Effets biologiques des radiations ionisantes

Les rayons ionisants interagissent avec les éléments du milieu dans lequel ils pénètrent en transférant leur énergie aux atomes des molécules. Cela provoque l'excitation ou l'ionisation de leurs atomes [15], aboutissant à la formation de radicaux libres [15, 41]. Ces derniers vont provoquer des lésions de l'ADN et d'autres molécules impliquées dans l'expression et la transmission du patrimoine génétique (ARN). L'atteinte de ces molécules aura pour conséquence la mort cellulaire, une incapacité à se diviser, des mutations, voire une cancérisation [15, 41]. La mort des cellules va entraîner un déficit cellulaire et donc des lésions tissulaires. Cela aboutira à une altération de l'organe qui se traduira par des manifestations pathologiques (figure 31) [15].

Le processus pathologique débute donc immédiatement après l'irradiation, mais les manifestations cliniques et histologiques sont issues d'une réaction en cascade. En conséquence, elles peuvent ne se déclarer que des jours, des semaines, des mois, voire des années après l'irradiation [41].

Les dommages radio induits sont communément classés comme aigus ou tardifs [41].

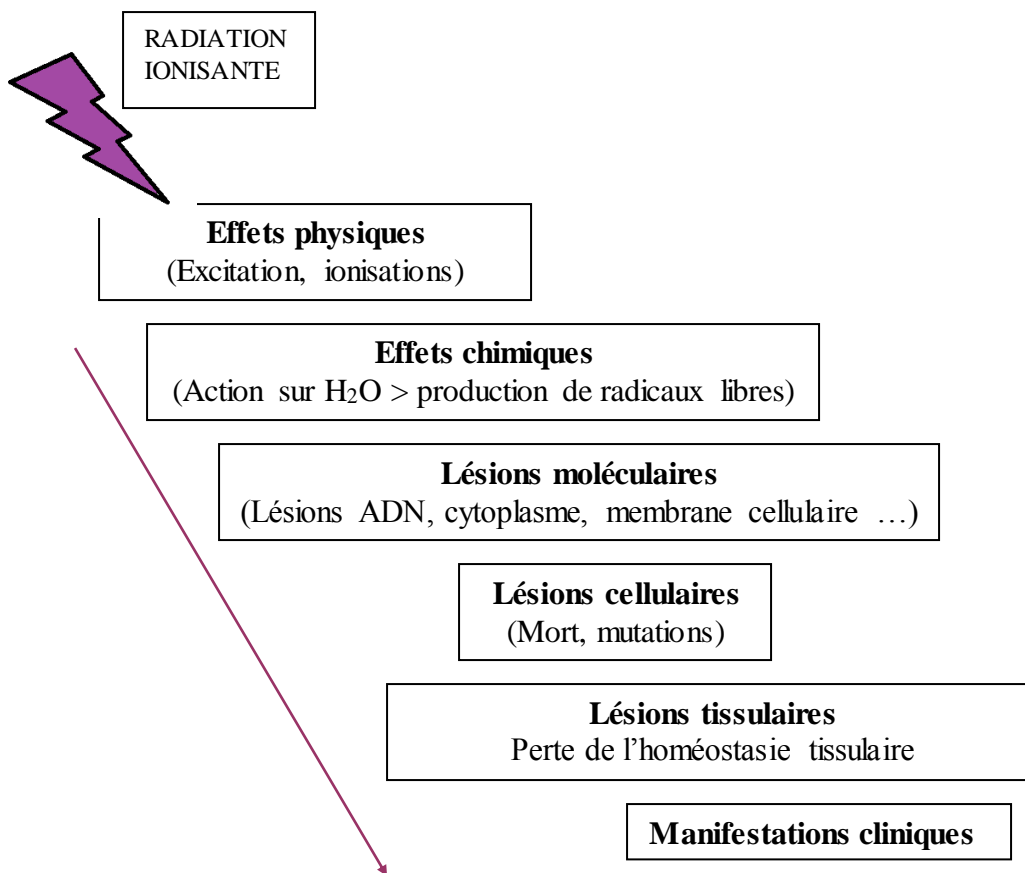


Figure 31 : Action des rayonnements ionisants sur la matière vivante : succession des phénomènes [15]

5.1.1. Lésions moléculaires

Les radicaux libres et les espèces d'oxygènes réactifs (Reactive Oxygen Species : ROS) produits vont provoquer des lésions génétiques (de l'ADN), par rupture double ou simple brin, par altération des bases ou des sucres ou par modifications de la structure de la molécule d'ADN. Ils créeront aussi des lésions épigénétiques en altérant des molécules impliquées dans la « lecture » du code génétique [15]. Les lésions directes ou indirectes de l'ADN sont considérées comme le phénomène fondamental à l'origine des effets des radiations ionisantes sur les tissus et l'organisme [15, 41].

La membrane cellulaire est également affectée par les radicaux libres et les ROS. Ces derniers vont provoquer des altérations des structures membranaires et des lésions des protéines [15, 41]. Des troubles de la perméabilité et de la mobilité membranaires sont également observés. Ces altérations sont dues à la dégradation des systèmes de transport de flux ionique et des récepteurs membranaires en cas de dose élevée [15].

Il existe également une altération cytoplasmique à l'origine de la déstabilisation de l'architecture cellulaire, par altération du cytosquelette [15].

5.1.2. Lésions cellulaires

Les lésions moléculaires décrites vont entraîner des modifications du cycle cellulaire (perturbations de la mitose, allongée ou retardée) et une réduction de l'espérance de vie de la cellule. Les altérations cellulaires seront létales ou non. Si la cellule survit à ces lésions, elle subit des mutations pouvant mener à sa cancérisation [41].

La mort cellulaire radio induite est une mort mitotique qui correspond à la perte de la capacité de prolifération des cellules irradiées [41]. Il s'agit d'une mort différée, génétiquement programmée, qui ne survient pas immédiatement suite à l'irradiation. La mort cellulaire ne s'exprime qu'au moment de la mitose, dès la première suivant l'irradiation ou après quelques mitoses efficaces [15, 41]. Si les mitoses sont rapprochées, la mort cellulaire sera plus précoce à cause de la fragilisation de l'ADN [15].

La radiothérapie repose sur le fait que les cellules cancéreuses se divisant de manière rapide sont plus radiosensibles que les cellules saines. De plus, les cellules cancéreuses ont un mécanisme de réparation moins performant que celui des cellules saines [41].

L'irradiation aura donc pour conséquence, au niveau des cellules saines, la mort des cellules souches (très peu différenciées, divisions fréquentes, donc fortement radiosensibles) ainsi que la diminution significative de la prolifération des cellules différenciées [41].

5.1.3. Lésions tissulaires

Chez l'adulte, un tissu est composé de populations cellulaires en équilibre, les cellules qui disparaissent sont remplacées par de nouvelles en permanence, maintenant l'homéostasie tissulaire. L'irradiation va rompre l'homéostasie en provoquant la mort de nombreuses cellules, dont les cellules souches. Cela entraîne un déficit cellulaire et donc une lésion tissulaire qui pourra aboutir à l'altération de l'organe. Les manifestations pathologiques sont le reflet de la lésion de l'organe et de l'altération de sa fonction [41].

5.1.4. Manifestations cliniques

Quelque soit la dose délivrée, l'exposition aux radiations ionisantes provoque une altération des tissus sains. Leur tolérance est la seule limite au traitement des tumeurs par radiothérapie [41].

5.1.4.1. Effets précoces

Par définition, les effets précoces apparaissent dans un délai de moins de 6 mois suivant l'irradiation [15]. Ils sont, en général, observés dans les tissus en prolifération ou en renouvellement [41]. Ils sont prévisibles et sont la conséquence directe de la diminution du nombre de cellules parenchymateuses fonctionnelles dans le tissu [41]. Par conséquent, les tissus avec un turn-over rapide montrent plus rapidement des signes cliniques [41].

Lors des radiothérapies concernant les cancers des VADS, les effets précoces fréquents sont les mucites et les dermites dans la zone irradiée [49].

Les réactions précoces peuvent gêner le traitement, mais elles restent le plus souvent acceptables pour le patient avec l'aide de médicaments symptomatiques [41].

5.1.4.2. Effets tardifs

Les effets tardifs, quant à eux, sont plus difficiles à prévoir. Ils se manifestent plus de 6 mois après le début de l'irradiation, parfois plusieurs années après [15]. Leur processus de développement est complexe et encore mal compris. Il repose sur l'atteinte de plusieurs compartiments cellulaires interdépendants : cellules parenchymateuses, endothéliales, mésenchymateuses (fibroblastes), ayant pour conséquence ischémie vasculaire, apoptose cellulaire, et fibrose [41]. Les effets tardifs spécifiques à l'os seront développés ultérieurement (cf. paragraphe 6.2).

D'une façon générale l'incidence des complications tardives et des séquelles de la radiothérapie reste insuffisamment connue [41].

5.2. Physiopathologie du tissu osseux irradié

L'analyse histopathologique du tissu osseux irradié montre une perte cellulaire osseuse, une altération de l'ostéogénèse ainsi qu'une ostéolyse au profit d'une fibrose. La conjugaison de ces lésions aboutit à une nécrose de l'os [2, 40]. Elle se caractérise par une dévitalisation des travées osseuses due à la destruction des ostéocytes et à la perte des ostéoblastes [2].

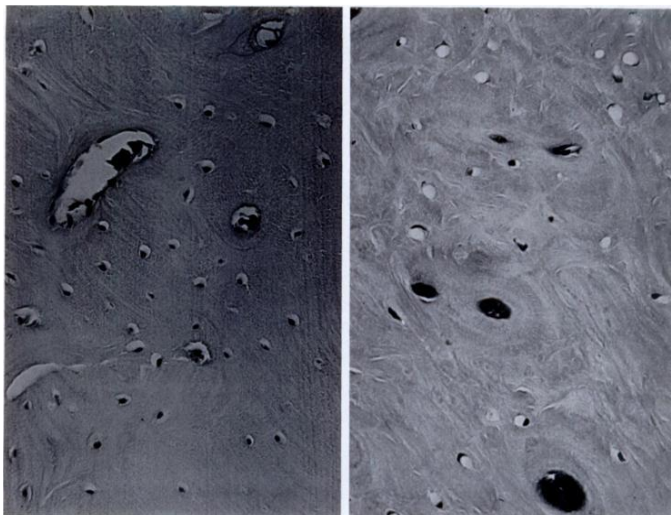
5.2.1. Hypocellularité osseuse

Les études concernant les effets des rayons ionisants sur les cellules osseuses sont contradictoires, en particulier concernant leur radiosensibilité mais il est admis que l'os est plus radiosensible que le cartilage, du fait de sa plus grande richesse en cellules osseuses et endothéliales [84]. Les études sur le sujet [1, 50, 67, 99] fournissent des résultats très hétérogènes et difficilement comparables.

Néanmoins une atteinte des lignées ostéoblastique [30], ostéocytaire [36] et ostéoclastique ainsi que des cellules souches hématopoïétiques a été mise en évidence (figure 32) [51]. Cette atteinte cellulaire est, tout d'abord, directement induite par les rayons ionisants, indépendamment de l'atteinte vasculaire [101].

Les dommages causés entraînent la mort cellulaire, l'altération du potentiel de différenciation cellulaire en réponse au microenvironnement, ou bien encore une diminution de l'activité mitotique et enzymatiques des cellules restantes [79]. La dysfonction des cellules osseuses entraîne un déséquilibre entre formation et résorption osseuse [36, 51].

Les lignées hématopoïétiques sont particulièrement sensibles aux radiations ionisantes. Leur irradiation à des doses thérapeutiques entraîne une diminution voir une disparition des cellules souches [84].



32 A

32 B

Figure 32 : Hypocellularité osseuse post irradiation [67]

Coupes osseuses décalcifiées de fémur à 2 semaines post irradiation. (Coloration hématoxyline-éosine, grossissement x500)
32A : os non irradié : ostéoplastes sains
32B : os irradié, perte cellulaire, ostéoplastes vides

5.2.2. Fibrose médullaire

Suite à l'irradiation, se produit une hypoplasie, voire une aplasie de la moelle osseuse, de manière permanente [27, 35, 40]. Il s'agit d'une manifestation commune, qui survient, de manière locale, plusieurs mois après le traitement par rayons ionisants. Il se produit une diminution ou une destruction des cellules hématopoïétiques [35], remplacées dans un premier temps par un envahissement adipeux des espaces médullaires (figure 33) [37, 67]. La moelle prend alors un aspect jaune, gélatineux, hypoplasique.

Après colonisation des espaces médullaires par les adipocytes, une fibrose en nappe apparaît, se prolongeant dans les espaces haversiens élargis, décrivant ainsi une lésion chronique [70].

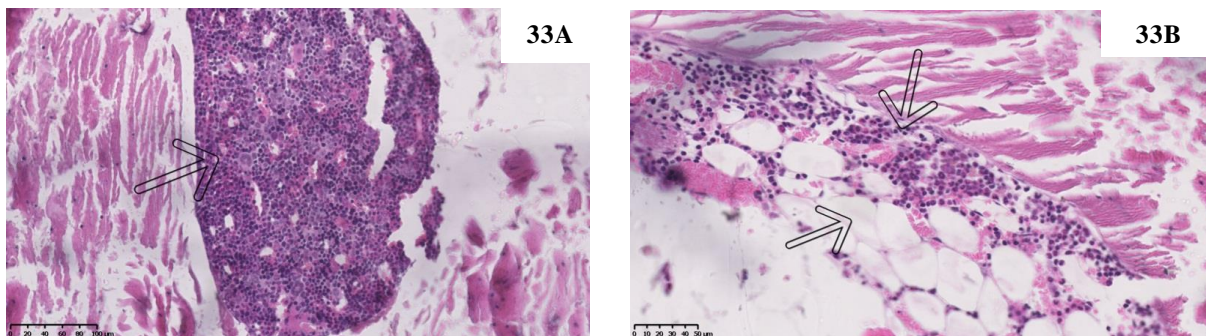


Figure 33 : Fibrose médullaire post irradiation [LIOAD]

Coupe osseuses non décalcifiées (Coloration Hématoxyline-Eosine)

33A : moelle de rat non irradié : nombreuses cellules hématopoïétiques, peu d'adipocytes

33B : moelle de rat irradié 50 gray : augmentation notable du nombre d'adipocytes au sein de la moelle osseuse

5.2.3. Ischémie vasculaire

Les cellules endothéliales sont des cellules à division rapide et présentent donc une sensibilité accrue aux effets des rayons ionisants. Après une irradiation à dose thérapeutique, les auteurs ont constaté une dilatation précoce des vaisseaux, suivie d'une vasoconstriction chronique (figure 34) [57, 80]. Dans certaines études la dilatation des capillaires est associée à une résorption de la matrice osseuse périvasculaire [80]. L'irradiation provoque également une décroissance capillaire dose et temps dépendante, affectant aussi bien le compartiment médullaire que cortical [57, 75, 80]. Il semblerait exister une corrélation entre la densité capillaire et le nombre d'ostéocytes restants, ainsi qu'entre la densité capillaire et la porosité

osseuse [57]. Logiquement, cette raréfaction vasculaire entraîne une diminution de la perfusion osseuse et donc une ischémie tissulaire [69, 70, 80].

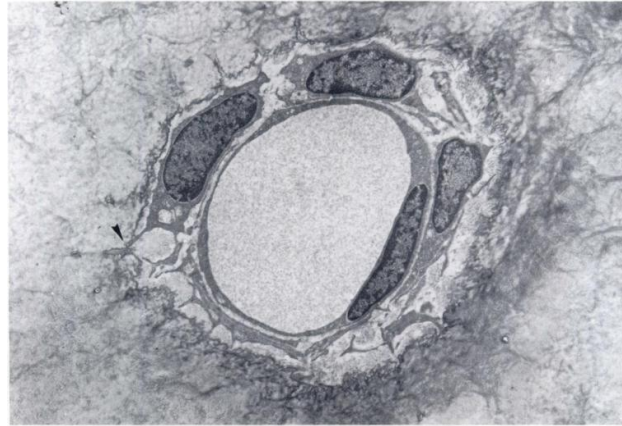


Fig 34A : Canal haversien sain dans un os plat (x2500)

On peut observer un capillaire avec une paroi capillaire continue et une membrane basale. L'espace extravasculaire est occupé par trois cellules probablement de la lignée ostéoblastique

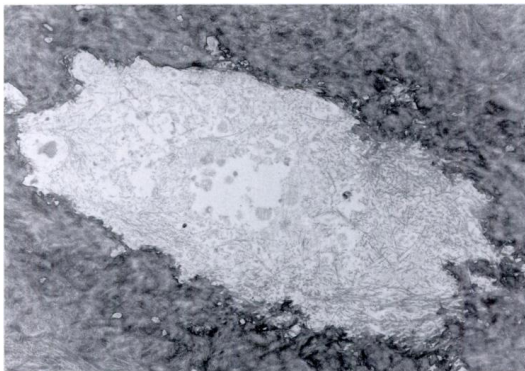


Fig 34 B : Canal haversien complètement dévitalisé (x3000)

52 semaines après irradiation à 50 Gy.

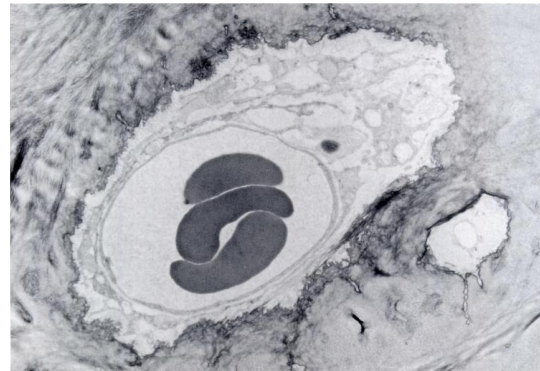


Fig 34 C : Canal haversien partiellement dévitalisé (x3500)

52 semaines après irradiation à 25 Gy
Absence de cellules endothéliales, malgré le fait qu'il y ait toujours un flux sanguin.
Le tissu extravasculaire est acellulaire.

Figure 34 : Effets de l'irradiation sur la vascularisation osseuse [101]

5.2.4. Altérations de la structure osseuse

L'irradiation provoque également une altération de la microarchitecture osseuse, liée à un déséquilibre, variable dans le temps, entre l'atteinte tissulaire radio induite et les possibilités de régénération osseuse [79].

Deux phases sont distinguables. La première, lésionnelle, montre des signes d'ostéoporose avec un amincissement des travées osseuses (atrophie osseuse) et une calcification normale [27, 92]. La seconde, phase de lésion constituée, montre un os d'aspect patégoïde (avec une structure trabéculaire désorganisée), déminéralisé [92].

Dans le cadre de l'ostéoradionécrose mandibulaire, Dambain a décrit trois mécanismes de résorption osseuse post-radique [20]. La première est une résorption ostéoclastique par ostéoporose progressive suite à la perte des cellules souches hématopoïétiques qui est mal compensée par une ostéogénèse tardive défailante. La seconde est une lyse ostéocytaire, que certains considèrent comme pathognomonique de l'ORN [2]. Elle se caractérise par une résorption osseuse par halo périphérique autour de l'ostéocyte, accompagnée d'une altération des fibres de collagène et d'une fuite de sels minéraux. La dernière est une résorption chimique par dissolution simple, de type érosion de surface, sans intervention cellulaire. Cette érosion serait due au sang et à la salive [20].

L'os irradié présente, par conséquent, une augmentation de sa porosité et une diminution de sa corticale osseuse (figure 35) [67].

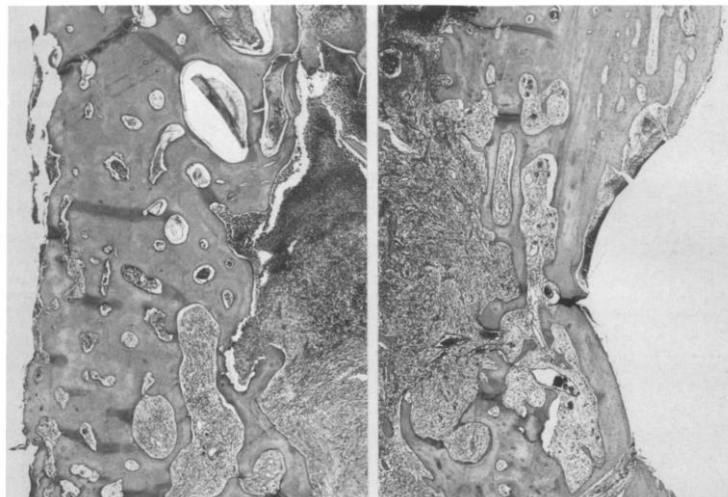


Figure 35 : Ostéoradionécrose de la mandibule [12]

(Coloration hématoxyline-éosine, grossissement x5)

5.2.5. L'ostéoradionécrose mandibulaire (ORN)

5.2.5.1. Définition

De nombreuses définitions sont émises, s'accordant sur le fait qu'il s'agit d'une nécrose osseuse secondaire aux radiations ionisantes utilisées à des fins thérapeutiques [85]. Il s'agit d'une complication tardive.

5.2.5.2. Epidémiologie

Il y a un manque de consensus sur la définition de l'ORN ; il est donc difficile d'obtenir une évaluation pertinente de la prévalence et de l'incidence de cette complication. De plus, les données sont limitées en termes d'études prospectives et la durée de suivi des patients entre les études est variable [66]. Les chiffres varient de 0 à 43 % chez les patients irradiés. Il existe cependant une décroissance importante de l'incidence de l'ORN depuis les années 70. L'incidence de l'ORN serait de l'ordre de 5% aujourd'hui [85].

5.2.5.3. Localisation

L'ORN se rencontre majoritairement au niveau de la mandibule, dans la zone prémolo-molaire. Ceci s'explique par plusieurs facteurs. Le premier est que la mandibule absorbe six fois plus de rayonnements ionisants que les tissus mous environnants du fait de sa structure fortement minéralisée [2,10].

De plus, la mandibule possède une vascularisation terminale. L'oblitération de l'artère alvéolaire inférieure consécutive à la radiothérapie n'est pas suppléée par l'artère faciale [10].

En outre, la région prémolo-molaire subit des charges plus importantes que la région incisive, de par sa position plus proche de l'articulation temporo-mandibulaire.

Les prémolaires et molaires présentent également des atteintes carieuses plus fréquentes et sont donc plus souvent extraites. Il s'agit donc d'une zone particulièrement soumise à traumatisme.

5.2.5.4. Diagnostic

Cliniquement, l'ORN a un délai d'apparition variable et se manifeste, de manière générale, suite à un traumatisme [10]. Il existe un risque à vie de développer une ORN suite à une radiothérapie de la région cervico-faciale [66].

Le diagnostic de l'ORN nécessite la mise en évidence d'une nécrose osseuse dans la zone d'irradiation indépendamment de toute récurrence cancéreuse [52]. Typiquement, l'ORN débute par une blessure muqueuse exposant l'os sous-jacent (figure 36), cependant il existe des cas de fracture osseuse spontanée sans exposition osseuse.

L'ORN est une complication extensive et irréversible. Les symptômes sont variables et peuvent aller de l'exposition osseuse peu étendue à la fracture pathologique [85]. Le patient peut également présenter des douleurs neuropathiques, un trismus ou une fistulisation [10, 85].

Les signes radiologiques n'apparaissent pas immédiatement, il est nécessaire d'atteindre un taux de déminéralisation significatif. La radiographie panoramique permettra de mettre en évidence une densification de la trame osseuse, puis une ostéolyse mal limitée, et enfin un séquestre osseux (figure 37) ou une fracture pathologique (figure 38). Cependant, le scanner reste l'examen de référence, permettant d'apprécier la sévérité de l'atteinte dans tous les plans de l'espace [92].



Figure 36 : Exposition osseuse endobuccale [82]



Figure 37 : Scanner mandibulaire horizontal, foyer d'ostéoradionécrose avec séquestre cortical interne au niveau de la branche horizontale gauche [85]



Figure 38 : Fracture pathologique bifocale de la branche horizontale droite avec séquestration [85]

5.2.5.5. Dose de tolérance de la mandibule

Les différents composants de l'os possèdent tous une radiosensibilité différente. Alors que les structures minéralisées sont peu radiosensibles, les cellules osseuses, médullaires et vasculaires, quant à elles, ont une radiosensibilité importante. L'interaction des lésions cellulaires, vasculaires et métaboliques provoquera des lésions irréversibles de l'os comme la nécrose.

La tolérance des différents organes aux radiations ionisantes n'est pas connue précisément, il ne s'agit que de données empiriques [97]. Les seules études réalisées sur le sujet sont des études rétrospectives ; il n'existe pas d'études prospectives.

Les deux facteurs associés au risque le plus élevé d'ORN sont une dose supérieure à 66 grays et la notion d'un traumatisme mandibulaire avant ou après la radiothérapie. Cependant la dose en elle-même ne peut prédire un risque absolu. Il persiste donc une incertitude sur les doses de tolérance de la mandibule et notamment sur le rapport dose/volume et dose/temps [10]. Bien qu'un lien soit établi entre la dose de rayonnements ionisants reçue et l'ORN, aucun seuil exact n'est établi.

5.2.5.6. Théories de la physiopathologie de l'ORN

L'ostéoradionécrose des maxillaires a été décrite pour la première fois par Régaud en 1922 [86]. Depuis, de nombreuses théories ont été émises quant à l'origine et aux mécanismes physiopathologiques de l'ORN. Les premières hypothèses décrivaient l'introduction d'un

sepsis microbactérien par un traumatisme dans un os avasculaire dévitalisé, produisant une ostéomyélite avec destruction tissulaire [72, 107]. Il s'agit de la triade Irradiation – Traumatisme – Infection [72]. Depuis, il est devenu clair que les micro-organismes ne jouent qu'un rôle de contaminant en surface de la plaie et ne sont pas à l'origine de l'ORN [50].

5.2.5.6.1. Marx

En 1983, Marx, après l'étude de 26 cas d'ORN, propose une nouvelle théorie sur la physiopathologie de l'ORN. Il n'a retrouvé aucun germe en profondeur et a donc conclu que la flore buccale ne jouait qu'un rôle de contaminant de surface. Marx a également observé des cas d'ORN sans traumatisme initial. Il émet donc l'hypothèse que l'ORN est due, suite à l'irradiation, à la formation d'un tissu hypoxique, hypovasculaire et hypocellulaire. Cela aboutit à la formation d'un dommage tissulaire qui ne cicatrise pas (figure 39). Cette théorie fournit ainsi une explication aux ORN aseptiques et atraumatiques [69]. Il s'agit de la théorie des 3H.

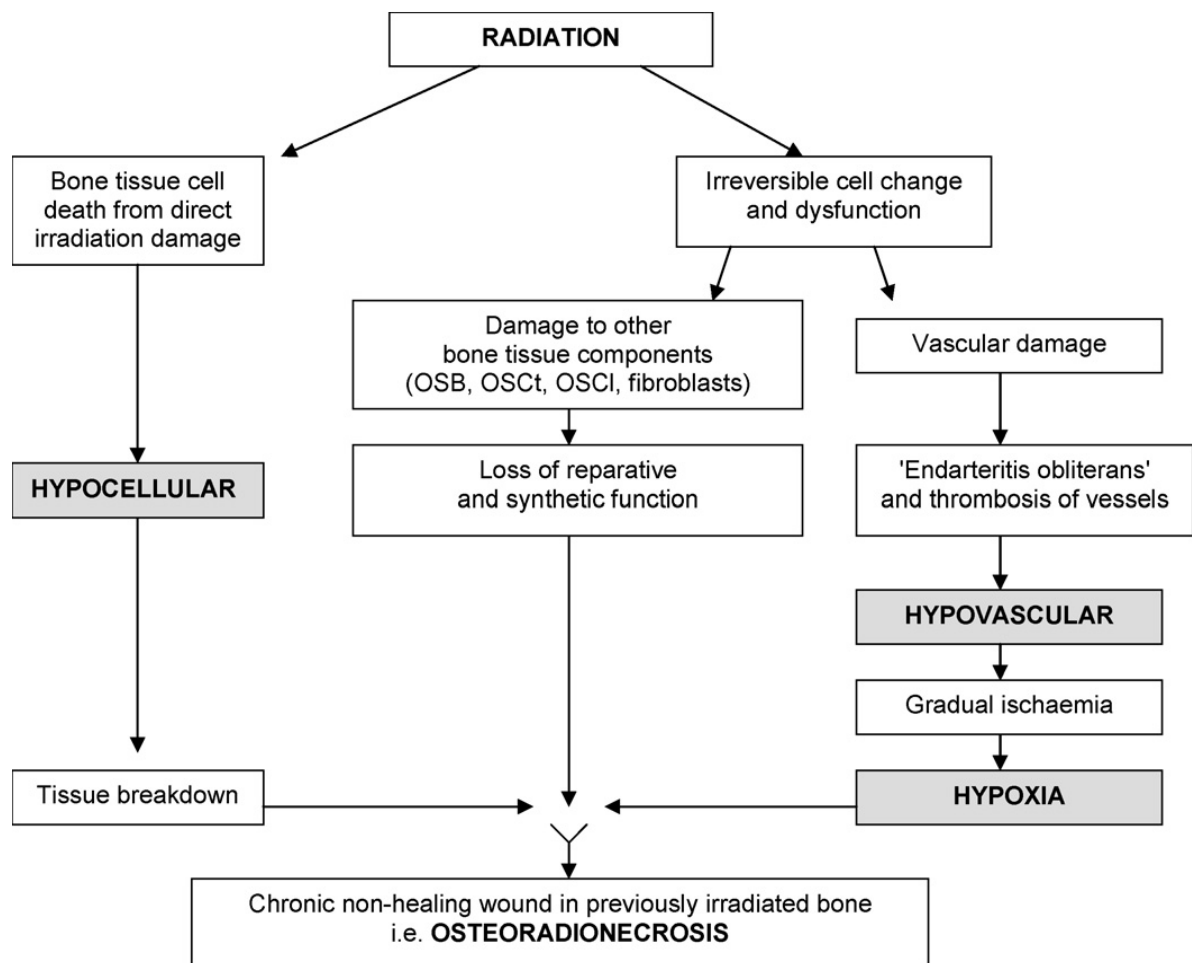


Figure 39 : Physiopathologie de l'ORN selon Marx [66]

5.2.5.6.2. Bras

En 1990, Bras reprend le concept de Marx et étudie 17 cas d'ORN mandibulaire en histologie et retrouve une sténose de l'artère alvéolaire inférieure récurrente. L'étude de la vascularisation de la mandibule lui fait dire que l'ORN est une nécrose ischémique plutôt qu'une atteinte primaire de la moelle osseuse (figure 40) [12].

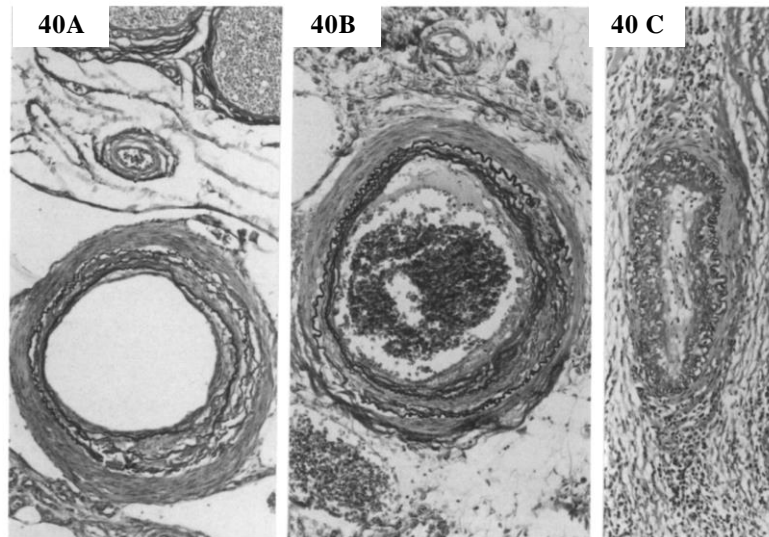


Figure 40 : Sténose de l'artère alvéolaire inférieure (AAI) suite à irradiation [12]

40 A : AAI d'une mandibule non irradiée, fibrose intimale minime

40 B : mandibule irradiée non ostéoradionécrotique : fibrose intimale au centre

40 C : mandibule ostéoradionécrotique : fibrose intimale oblitératrice avec distorsion et endommagement du mur vasculaire.

Coloration de Weichert, grossissement x32

5.2.5.6.3. Dambrain

Trois ans plus tard, Dambrain reprend la théorie de l'ischémie mais y rajoute le concept d'infection, s'opposant à la thèse des 3H de Marx. Il a en effet réalisé une étude micro radiographique mettant en évidence les différents mécanismes de résorption osseuse lors de l'ORN : mécanisme cellulaire (ostéoclastique et ostéocytaire) et chimique (pus et salive). Il a également observé une ischémie locale par atrophie et fibrose vasculaires au centre des canaux haversiens [20, 92]. Sa théorie met en avant les phénomènes infectieux et ischémique et est généralement connue comme la théorie des 2 I.

La théorie des 3H et celle des 2 I s'opposent sur le concept d'infection mais se rejoignent à propos de l'ischémie et de l'hypovascularisation.

5.2.5.6.4. Théorie fibroatrophique (ou RIF : Radiation Induced Fibrosis)

Dès les premières utilisations des rayons X dans le cadre des traitements des cancers, une fibrose radio-induite a été remarquée. Cependant, les mécanismes sous-tendant cette fibrose sont longtemps restés non élucidés. Les récents progrès en matière de biologie cellulaire et moléculaire ont permis de mieux comprendre la physiopathologie de ces lésions [22]. Il s'agit d'un processus irréversible et inévitable, pouvant survenir des années après la radiothérapie [113]. Après ce traitement, les tissus sains irradiés montrent toujours des signes d'atrophie et de fibrose à des degrés divers [24].

La fibrose radio induite présente trois phases : la première pré-fibrotique, la seconde organisée et la dernière fibroatrophique tardive [22, 24, 66, 113].

La phase initiale pré-fibrotique se caractérise par des changements au niveau des cellules endothéliales qui perdent leur rôle de barrière. Les cellules endothéliales sont atteintes directement par les radiations ionisantes ou par les radicaux libres. Une exacerbation de la réponse inflammatoire, qui devient chronique, est également typique de cette phase. Les cellules endommagées vont sécréter des cytokines pro inflammatoires, induisant une augmentation de l'inflammation. Cette dernière provoquera la production de radicaux libres par les phagocytes. En outre, les dommages causés aux cellules endothéliales vont entraîner une thrombose vasculaire menant à la nécrose des microvaisseaux et à une ischémie locale. De plus, la dégradation de la barrière endothéliale va permettre une extravasation accrue. Cela va induire une augmentation de la concentration des cytokines dans les tissus. Ces cytokines vont induire la transformation des fibroblastes en myofibroblastes [22, 66, 113]. Dans le processus physiologique de cicatrisation, les myofibroblastes produisent une matrice extra cellulaire (MEC) temporaire permettant la contraction de la blessure.

La phase organisée est prédominée par une activité anormale fibroblastique, et une désorganisation de la MEC. Lors d'un processus de cicatrisation classique les fibroblastes se transforment en myofibroblastes, avant de retrouver leur phénotype originel quand le processus cicatriciel est terminé. Dans le cadre de la RIF, le phénotype de myofibroblaste persiste, dérégulant le métabolisme collagénique et entraînant ainsi une désorganisation de la MEC [22, 66, 113].

Lors de la phase fibroatrophique tardive le tissu est fragile avec un risque de réactivation inflammatoire tardive en cas de blessure locale [22, 66, 113].

Il se produit donc un dérèglement général où l'atteinte des cellules endothéliales et l'activation des fibroblastes en myofibroblastes constituent les deux événements clés (figure 41) [113].

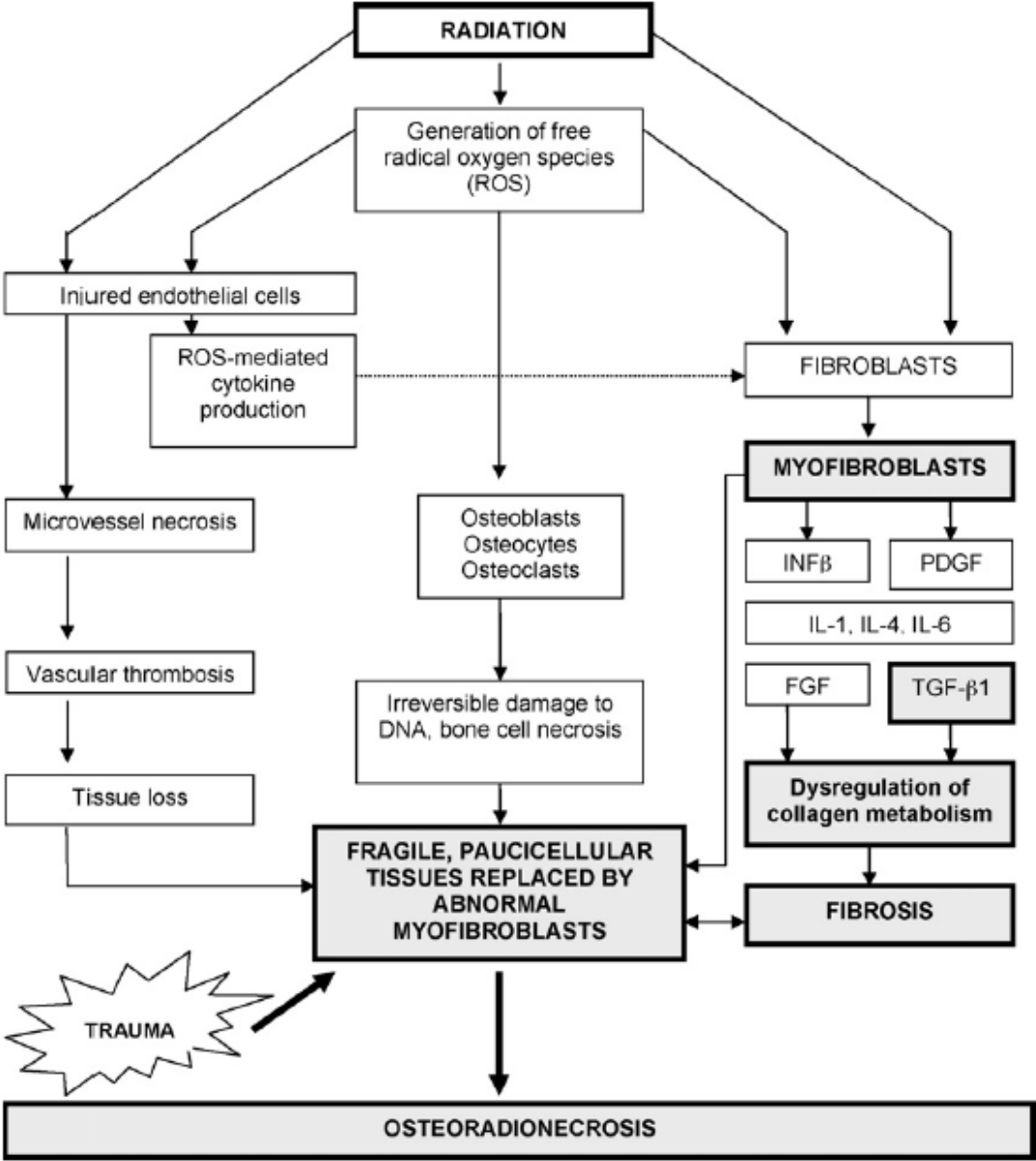


Figure 41 : Théorie RIF [66]

5.3. Effets des radiations ionisantes sur la microvascularisation osseuse

5.3.1. Atteinte vasculaire radio induite

L'endothélium a longtemps été perçu comme un simple tuyau, cependant il est aujourd'hui clair qu'il possède des fonctions endocrines, paracrines et autocrines (cf. §3). L'endothélium sain joue un rôle dans la régulation du tonus vasculaire, du flux sanguin ainsi que dans la maintenance de l'homéostasie vasculaire. Il possède également des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-athérogénique, anticoagulantes et des effets fibrinolytiques. L'endothélium est donc une structure indispensable au maintien de l'homéostasie tissulaire [45].

A peine quatre ans après la découverte des rayons X, la sclérose vasculaire était reconnue comme caractéristique des dommages radio-induits [25]. L'atteinte vasculaire touche toutes les structures : des capillaires aux grosses artères, en passant par le réseau veineux [37]. Le réseau capillaire est le plus touché, de par la radiosensibilité accrue des cellules endothéliales qui constituent la majorité du mur vasculaire de ces vaisseaux [25, 37]. L'atteinte endothéliale radio-induite va perturber l'ensemble des propriétés et fonctions sus décrites (figure 42).

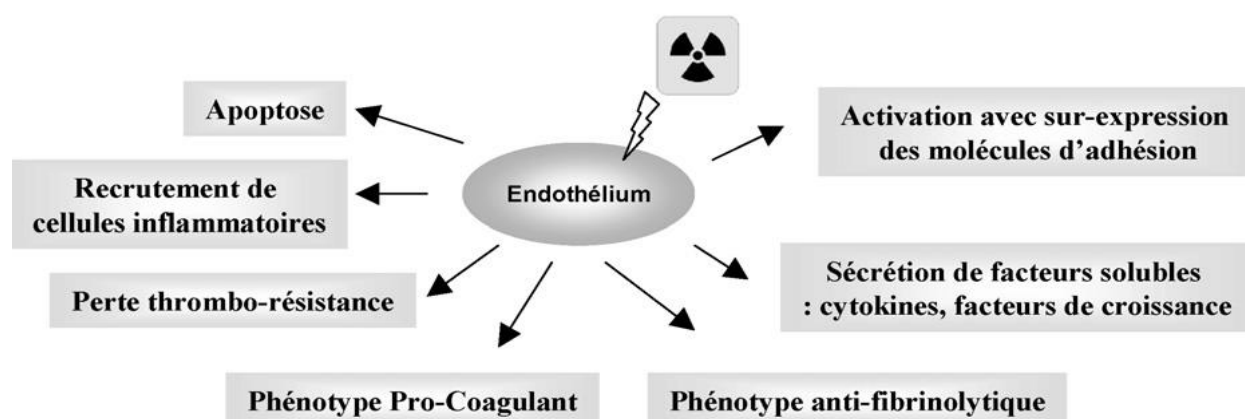


Figure 42 : Principaux effets des radiations ionisantes sur l'endothélium vasculaire [73]

5.3.1.1. Apoptose des cellules endothéliales

L'apoptose des cellules endothéliales a été documentée tant in vitro, qu'in vivo [25, 45]. Les cellules endothéliales ayant un cycle cellulaire rapide, elles sont particulièrement radiosensibles. L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales pourrait causer une augmentation de la perméabilité vasculaire [25]. Néanmoins, le rôle clef de l'apoptose endothéliale radio-induite reste encore aujourd'hui sujet à controverse. Sa participation dans les effets délétères tissulaires après irradiation fait toujours débat [73].

5.3.1.2. Dysfonctionnement du tonus vasculaire

L'endothélium sécrète des molécules régulant le tonus vasculaire, via des récepteurs sur les cellules musculaires lisses [73]. L'irradiation va provoquer le dérèglement de la balance vasodilatation/vasoconstriction [73]. Les vaisseaux vont d'abord se dilater [37, 59], pour ensuite se contracter de manière chronique. Cette contraction entraîne une diminution du flux sanguin et par conséquent une diminution de la perfusion tissulaire [45].

5.3.1.3. Augmentation de la perméabilité vasculaire

Les observations en microscopie optique ont permis de mettre en évidence des irrégularités du mur endothélial ainsi que des cellules endothéliales déformées et proéminentes [37]. L'étude de ces vaisseaux en microscopie optique a permis d'observer un détachement des cellules endothéliales de leur membrane basale [37]. Le mur endothélial devient très perméable, ce qui entraîne une extravasation et donc un œdème tissulaire [45]. Cela aboutit à une stase du flux sanguin au niveau de la zone irradiée [45].

5.3.1.4. Activation de l'endothélium

L'activation des cellules endothéliales en réponse à une blessure est un processus physiologique d'adaptation en vue de la réparation tissulaire. La nature et la durée de la réponse dépendent des stimuli reçus, un feedback négatif vient normalement arrêter le processus [45]. Dans le cadre d'une irradiation, le phénotype des cellules endothéliales est modifié de manière durable et les régulations physiologiques sont perturbées [25]. Cela

aboutit à la persistance de l'activation de l'endothélium : la réponse adaptative devient maladaptative [45].

Cette activation continue se traduit par l'augmentation de l'expression de protéines d'adhésion à la surface des cellules endothéliales [45, 73], augmentant les interactions plaquettes-endothélium. De plus, ces cellules vont augmenter leur production de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines [45, 73]. Ces molécules mènent à la formation d'un infiltrat inflammatoire chronique, produisant des protéases et des ROS. Cela pourrait contribuer à la fibrose et induire des dommages tissulaires [45]. L'inflammation chronique exacerbe la réponse aux radiations en amplifiant la dysfonction endothéliale et en augmentant les niveaux de cytokines et facteurs de croissance [25].

5.3.1.5. Activation du système de coagulation

Suite à un dommage tissulaire, l'activation du système de coagulation est un phénomène physiologique (cf. §6.2.5.) La radiothérapie ne provoque pas de lésion disruptive des vaisseaux mais active néanmoins le système de coagulation au sein des structures vasculaires intactes [25]. La fibrinogénèse est activée (augmentation de la production de thrombine entre autres) et la fibrinolyse inhibée, de manière concomitante, menant à un dépôt de fibrine anormal [25, 45]. La thrombine, outre son action sur la fibrinogénèse, agit également sur la perméabilité endothéliale et l'inflammation tissulaire, en maintenant cette dernière [25].

Les cellules endothéliales présentent donc une surface pro-coagulante permanente suite à l'irradiation [25, 45, 73]. Le maintien de la cascade de coagulation va mener à l'oblitération de la lumière vasculaire (thrombose), diminuant nettement la perfusion tissulaire [45].

L'hétérogénéité du réseau vasculaire fait que les conséquences des dysfonctionnements endothéliaux sont variables en fonction de la taille des vaisseaux [25]. La thrombose a lieu dans toutes les structures vasculaires (artères, capillaires, veines). Les gros vaisseaux sont beaucoup moins affectés grâce à leur lumière ample et leurs murs épais constitués de cellules relativement radio-résistantes qui les protègent [25].

5.3.1.6. Diminution de la densité du réseau microvasculaire

Bien que suspectée depuis plus d'un siècle, la diminution du réseau microvasculaire suite à l'irradiation n'a été mise en évidence que récemment [26, 38, 55]. La perte de segments entiers de capillaires et la rupture du mur capillaire avaient déjà été mises en évidence

antérieurement [37]. Les récentes études in vitro ont montré une diminution nette du volume de la fraction vasculaire sur les modèles animaux d'ORN par rapport aux témoins non irradiés [26, 38, 55]. L'atteinte vasculaire est dose et temps dépendante menant à la diminution de la densité capillaire et à leur oblitération [26, 38].

5.3.2. Place de l'atteinte vasculaire dans la physiopathologie du tissu osseux irradié

Comme vu précédemment, la physiopathologie des lésions tardives radio induites, relève d'une cascade d'évènements interdépendants, impliquant l'ensemble des compartiments tissulaires. Les mécanismes moléculaires en jeu dans la genèse des lésions tardives osseuses et de l'ORN en particulier ne sont pas encore tous élucidés.

Le manque de critères d'évaluation communs ainsi que la disparité des protocoles rendent difficiles la comparaison des études.

Si un lien a été souligné entre atteinte osseuse et atteinte vasculaire [79], rien ne permet, à l'heure actuelle, de savoir si l'ischémie tissulaire est la résultante des lésions tardives ou si elle en est la conséquence [7, 17, 25].

Le schéma ci-après est une proposition d'illustration de la place que peut avoir l'atteinte vasculaire dans la pathogénèse des lésions osseuses radio-induite (figure 43).

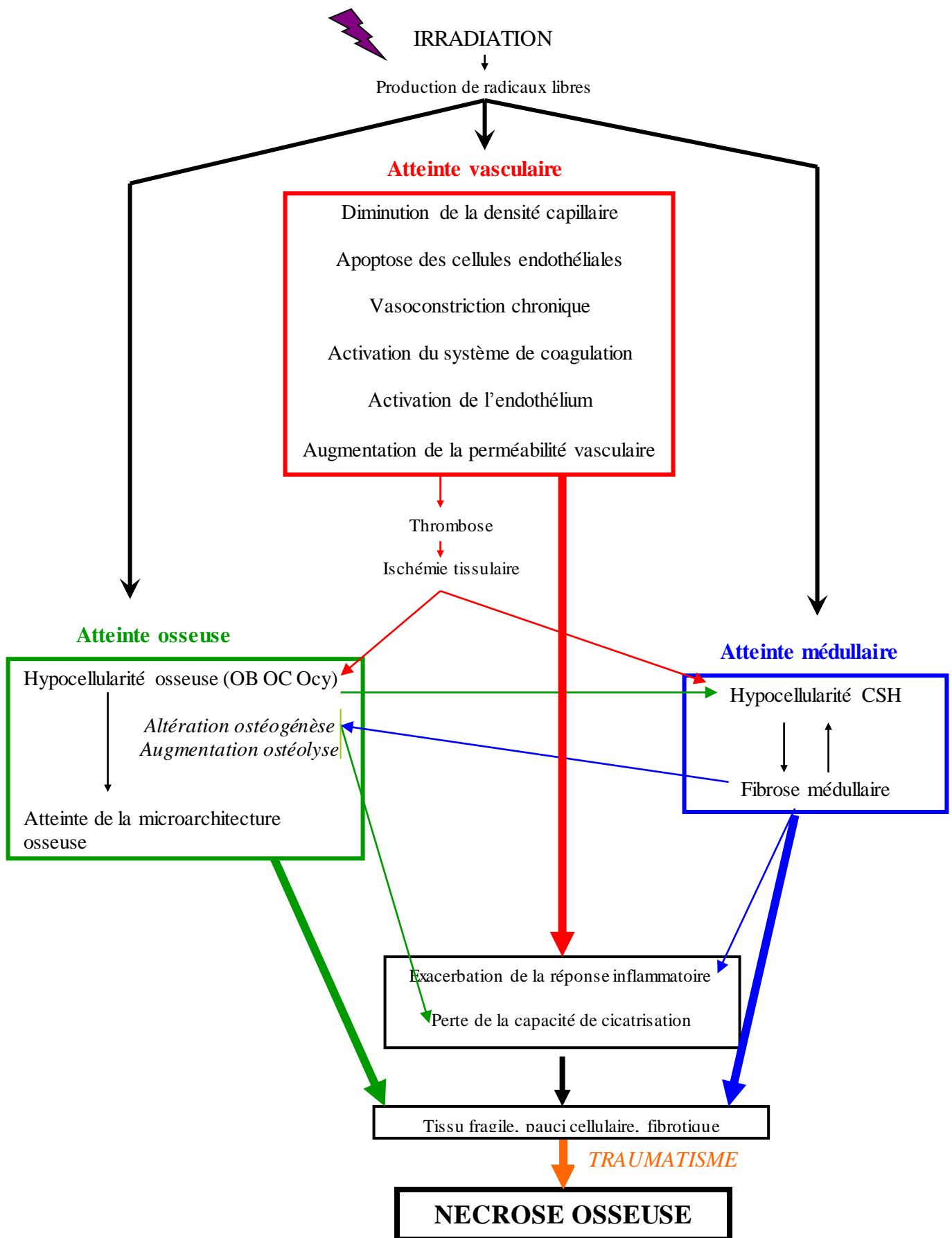


Figure 43 : Place de l'atteinte vasculaire dans la physiopathologie du tissu osseux irradié : proposition au vu des données actuelles

6. L'EXPERIMENTATION

6.1. Justification et objectifs de l'étude

Comme souligné précédemment, les cancers de VADS ont une prévalence importante au sein de la population française et mondiale [49]. Les conséquences de leurs traitements (radiothérapie et chirurgie) sont particulièrement lourdes, tant sur le plan esthétique que fonctionnel. L'ORN est une des conséquences les plus graves du traitement par radiothérapie, et sa physiopathologie, bien qu'étudiée depuis de nombreuses années (cf. § 5.2.5.), est encore mal élucidée. L'analyse bibliographique réalisée a permis de mettre en évidence les relations étroites entre les métabolismes osseux et vasculaires et en particulier, la place de la microvascularisation dans la physiologie osseuse. Et bien qu'évoquée à de multiples reprises (cf. § 5.2.5.6.), l'étiologie ischémique de cette nécrose n'a pas encore été clairement mise en évidence. La mise au point récente de nouvelles techniques d'investigation (micro scanner) offre la possibilité d'investiguer de nouveaux territoires. Les études s'intéressant à la quantification de la diminution vasculaire au sein de l'os suite à une radiothérapie sont récentes [26, 38, 55] et encore peu nombreuses.

Une meilleure compréhension de la place de l'atteinte vasculaire dans la physiopathologie de l'ORN pourrait ouvrir la voie à la mise au point de techniques innovantes et moins mutilantes pour son traitement.

Cette manipulation a donc eu pour but de mettre en évidence les effets de l'irradiation sur la microvascularisation osseuse mandibulaire dans un modèle murin d'ORN. A cet effet, différentes méthodes ont été utilisées (microscanner, histologie, MEB). Différents protocoles ont été mis au point afin d'étudier les effets de l'irradiation à doses thérapeutiques sur des coupes osseuses mandibulaires non décalcifiées.

6.2. Matériels et méthodes

6.2.1. Modèle d'Ostéoradionécrose mandibulaire chez le rat

6.2.1.1. Animaux

L'étude a été réalisée sur 19 rats Sprague-Dawley mâles âgés de 8 semaines à leur arrivée. Les animaux étaient issus de l'élevage des laboratoires Charles River à Lyon. Ils ont

été hébergés à l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) à Paris (N° agrément C92-032-01 délivré le 23 juin 2011). Un délai d'acclimatation de 10 jours a été respecté. Les rats étaient visités quotidiennement, nourris ad libitum et pesés chaque semaine. Les expérimentations animales ont été conduites à l'IRSN dans le respect de la directive européenne réglementant la conduite des expérimentations animales (DE 86/609/CEE; modifiée DE 2003/65/CE)

6.2.1.2. Protocole d'irradiation

Les animaux ont été irradiés au niveau de la mandibule par une unidose de 35 ou 50 Gy. Les irradiations ont été effectuées sous anesthésie générale selon le protocole suivant (figure 44) : induction anesthésique par inhalation d'isoflurane (Forène®, Abbott France, Rungis, France) dans une chambre d'induction close à une concentration de 4%, puis au masque à 2% à l'installation Alphée. Alphée est un irradiateur de type accélérateur (Energie max est de 4 MeV pour une énergie moyenne d'environ 1,5 MeV et l'ampérage est de 30 kA ; débit de dose 2,4 Gy par min).

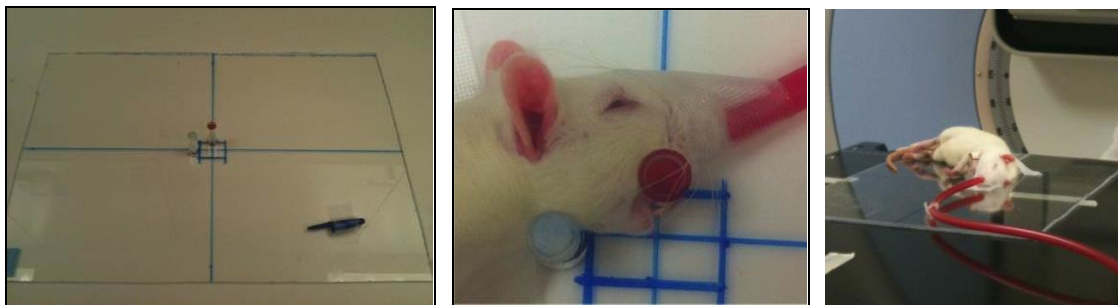


Figure 44 : Protocole d'irradiation des rats

A gauche, plaque utilisée pour le positionnement des animaux lors des irradiations montrant la fenêtre de 2cm par 3cm sur laquelle sera focalisé le faisceau d'irradiation. Au milieu, positionnement d'un animal, montrant que seule la mandibule sera irradiée. A droite, animal positionné dans l'irradiateur, sous anesthésie générale.

6.2.1.3. Avulsions

Les extractions des deuxièmes molaires mandibulaires gauches (figure 45) ont été réalisées trois semaines après les irradiations sous anesthésie générale (Kétamine 100mg/kg et xylazine 10mg/kg en injection intra péritonéale).

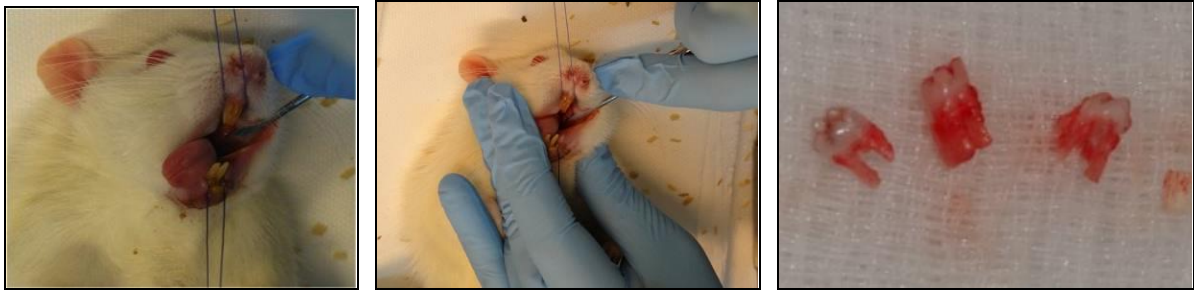


Figure 45 : Extractions de la deuxième molaire mandibulaire gauche

6.2.1.4. Injection du produit de contraste, euthanasie, explantation

Neuf semaines après les irradiations, les injections de produit de contraste ont été réalisées sous anesthésie générale selon le protocole suivant : induction anesthésique par inhalation d'isoflurane (Forène®, Abbott France, Rungis, France) dans une chambre d'induction close à une concentration de 4%, puis au masque à 2%. Après l'ouverture de la cavité abdominale, une thoracotomie est réalisée. Un cathéter est ensuite planté au niveau de la pointe du ventricule gauche. Le cathéter est ensuite relié au travers d'une pompe péristaltique (figure 46) à un récipient contenant le produit de contraste (Sulfate de baryum (Micropaque)-1,5% de gélatine- PBS). Un prélèvement intracardiaque de sang est effectué. Après section de l'oreillette droite, 150 ml de produit de contraste sont injectés dans la circulation sanguine jusqu'à blanchissement des extrémités des animaux. Ensuite les mandibules sont prélevées de manière stérile et mis dans un milieu de culture.

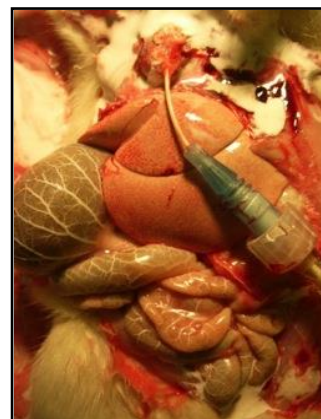


Figure 46 : Injection du sulfate de Baryum

Matériel pour les injections de sulfate de baryum (A) et image du cathéter implanté dans le ventricule gauche et de la vascularisation qui se colore en blanc (B).

6.2.1.5. Design de l'expérimentation

Rat	IRRADIATION		EXTRACTION / 3 sem.		INJECTION / 9 sem.		
	Date	Dose	oui	non	oui	non	
1	12/07/2013	35 Gy			x		35 Gy / NE / Inj.
2	12/07/2013	50 Gy			x		50 Gy / NE / Inj.
6	19/07/2013	35 Gy	x		x		35 Gy / Ext. / Inj.
7	19/07/2013	35 Gy	x		x		35 Gy / Ext. / Inj.
8	19/07/2013	35 Gy	x			x	35 Gy / Ext. / NI
9	19/07/2013	35 Gy		x	x		35 Gy / NE / Inj.
10	19/07/2013	35 Gy		x		x	35 Gy / NE / NI
1	19/07/2013	50 Gy	x		x		50 Gy / Ext. / Inj.
2	19/07/2013	50 Gy	x		x		50 Gy / Ext. / Inj.
3	19/07/2013	50 Gy	x			x	50 Gy / Ext. / NI
4	19/07/2013	50 Gy		x	x		50 Gy / NE / Inj.
5	19/07/2013	50 Gy		x		x	50 Gy / NE / NI
T1 ext	/	0	x		x		Ext. / Inj.
T2 ext	/	0	x		x		Ext. / Inj.
T3 ext	/	0	x			x	Ext. / Inj.
T1 non ext	/	0		x	x		NE / Inj.
T2 non ext	/	0		x	x		NE / Inj.
T3 non ext	/	0		x		x	NE / Inj.
T4 non ext	/	0		x		x	NE / Inj.

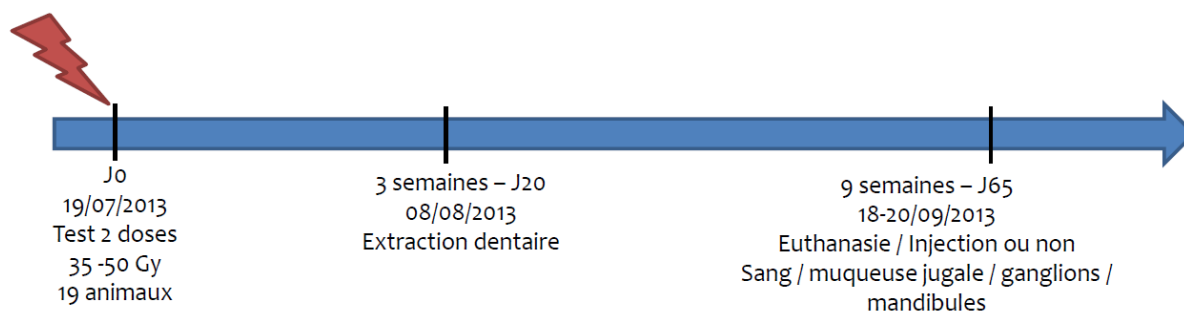


Figure 47 : Design expérimental

6.2.2. μCT

Les échantillons sont passés avant inclusion au microscanner. Celui utilisé dans cette expérimentation est un Skyscan 1272 (Bruker) à une résolution de 6 micromètres. Les paramètres utilisés sont : 100kV / 100μA; filtre aluminium 0.5 mm; 0.45° on 180°; temps d'exposition: 2.8 sec.

Le logiciel NRecon Reconstruction est utilisé afin de reconstruire les volumes 3D (figure 47). Ensuite le logiciel CtVox est utilisé pour modéliser les arbres vasculaires 3D et le logiciel CtAn pour calculer les paramètres de la microarchitecture vasculaire.

Les paramètres de la microarchitecture vasculaire, calqués sur ceux de la microarchitecture osseuse sont : Volume vasculaire (VV), Nombre de Vaisseaux (VN), Epaisseur Vasculaire (V.Th), Séparation Vasculaire (V.Sp), Diamètre Vasculaire (V.Dm).

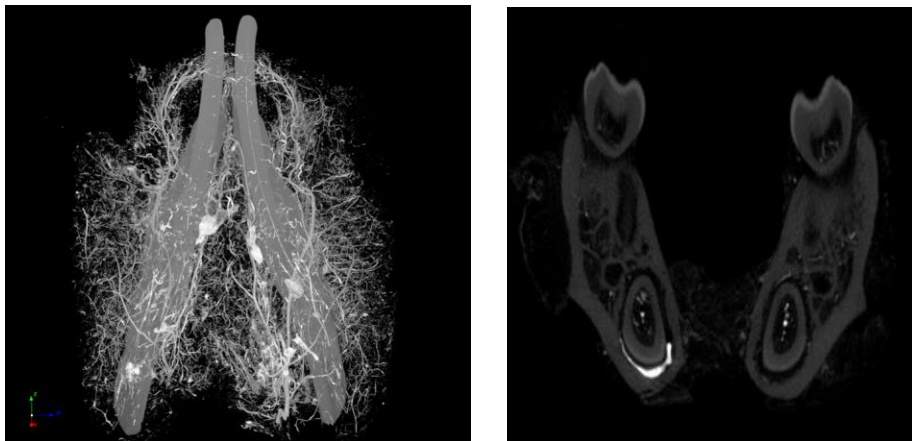


Figure 48 : Image d'un volume 3D et coupe longitudinale 2D d'une mandibule après perfusion avec du sulfate de baryum et acquisition au microscanner 1272 à une résolution de 6 micromètres

6.2.3. Inclusion

L'inclusion des explants a été réalisée, sans décalcification, dans de la résine Technovit ®. Cette résine méthacrylate de méthyle, permet d'obtenir des résultats pour les méthodes suivantes : colorations classiques, techniques immunohistochimiques, techniques enzymatiques et hybridation in situ.

Le protocole est détaillé en annexe n°1.

6.2.4. Coupes

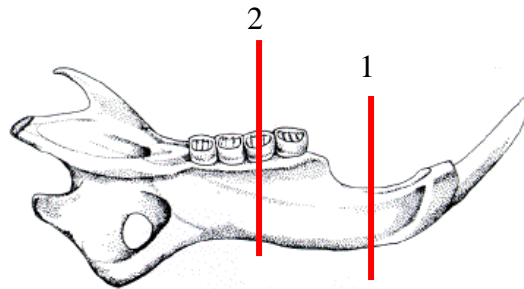


Figure 49 : Niveaux de coupe

Les blocs sont ensuite taillés sur une ponceuse Rotronic (Reitel®, Bad Essen, Allemagne) et polis afin d'obtenir des échantillons de forme carrée.

Ils sont ensuite coupés à deux niveaux grâce à une scie à disque diamanté (LEICA SP1600, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne) (figures 49, 50 et 51).

Les niveaux de coupes correspondent à la localisation de défauts osseux. Le premier au niveau incisif et le second au niveau de la 2^e molaire (extraite ou non). Trois blocs sont alors obtenus pour l'analyse histologique et l'analyse en microscopie électronique à balayage.

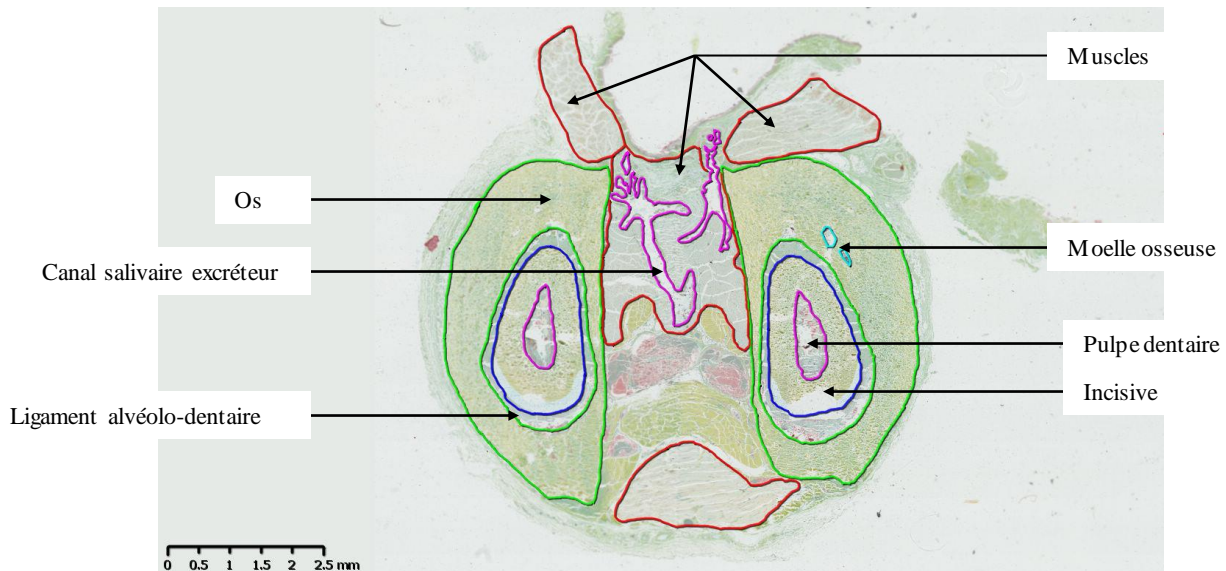


Figure 50 : Coupe au niveau incisif (niveau 1): mise en évidence des structures

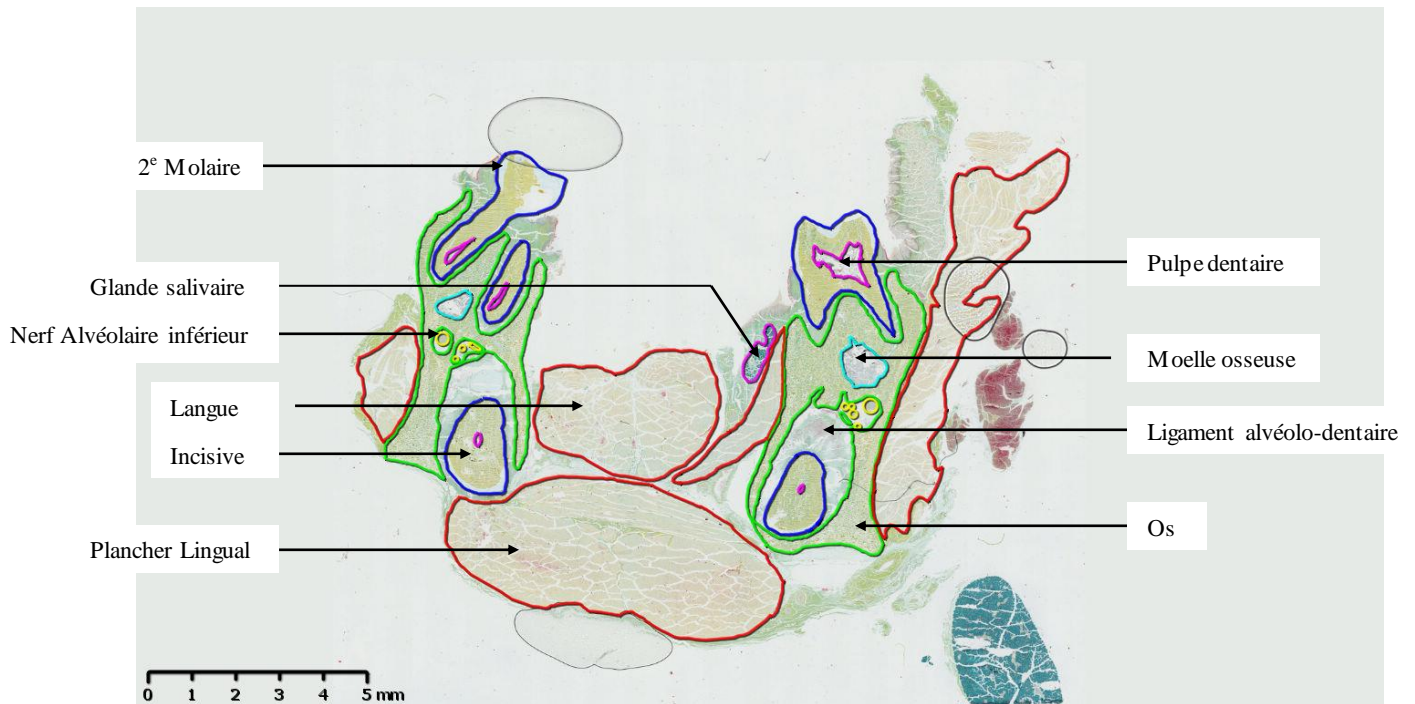


Figure 51 : Coupe au niveau molaire (niveau 2) : mise en évidence des structures

Les blocs sont recoupés grâce au microtome pour tissu dur (Polycut LEICA SM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne (figures 52 et 53)) afin d'obtenir des coupes de 5 μm d'épaisseur.

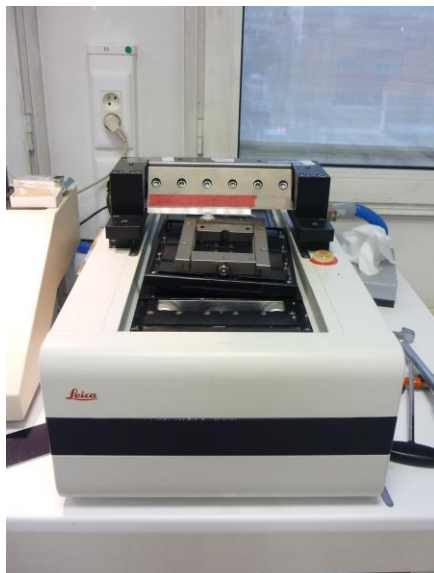


Figure 52 : Polycut Leica ®

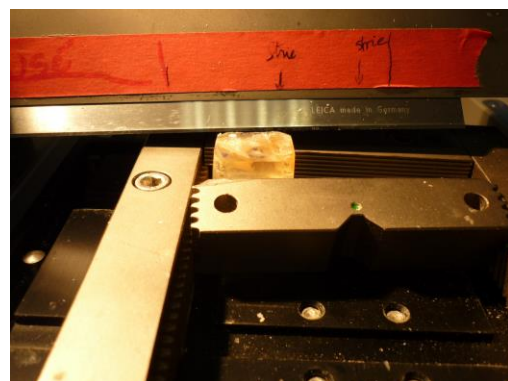


Figure 53 : Mise en place de l'échantillon

6.2.5. Analyses histologiques

Les coupes sont ensuite colorées à l'aide d'un automate de coloration (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (figure 54)). Deux types de coloration sont réalisés : une au pentachrome de MOVAT et une à l'hématoxyline-éosine (HE).

Les protocoles suivis pour ces deux colorations sont détaillés en annexes 2 et 3.



Figure 54 : Automate de coloration Thermo Fisher Scientific

Après la coloration les coupes sont montées entre lame et lamelle pour observation (figures 55 et 56).



Figure 55 : Montage entre lame et lamelle (coloration MOVAT)



Figure 56 : Lames montées (coloration MOVAT)

6.2.6. Analyses immunohistochimiques (IHC)

L'analyse immunohistochimique est faite par marquage CD31+ (Cluster of Differentiation 31). Cette molécule est exprimée, entre autres, au niveau des jonctions entre cellules endothéliales. Elle permet donc la mise en évidence des parois vasculaires (figure 57).

Le protocole et les réactifs utilisés sont détaillés en annexe n°4.

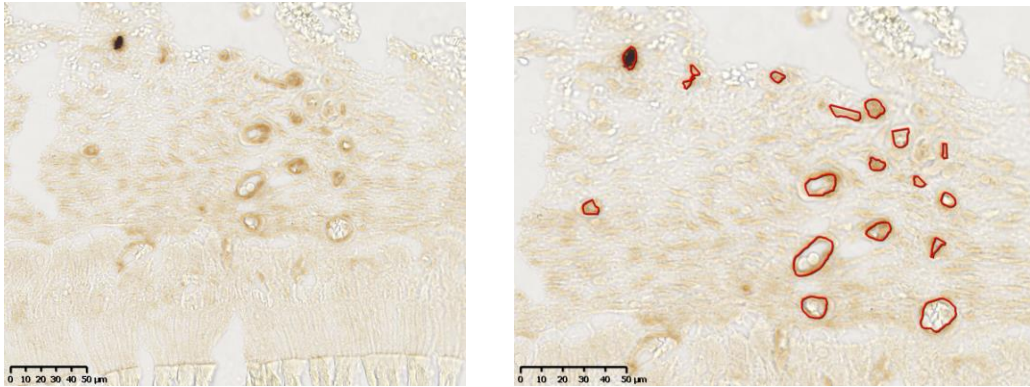


Figure 57 : Marquage CD31 de la paroi endothéliale capillaire (mandibule de rat non décalcifiée)

6.2.7. Analyses de l'activité ostéoclastique

La coloration de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) est une technique de coloration destinée à mettre en évidence l'activité de l'enzyme sur une coupe (figures 58 et 59). La TRAP n'est pas exclusivement exprimée par les ostéoclastes. Néanmoins il s'agit d'un marqueur de l'activité ostéoclastique.

Le protocole est détaillé en annexe n°5.

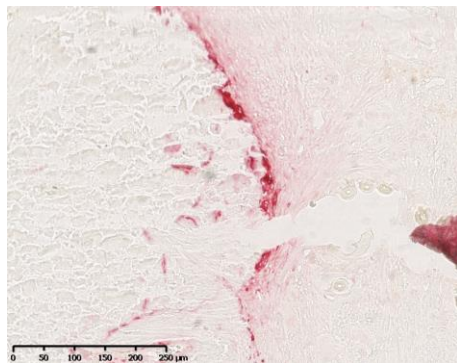


Figure 58 : Marquage TRAP sans contre-coloration au niveau de l'alvéole d'une dent extraite en site irradié (mandibule de rat non décalcifiée)

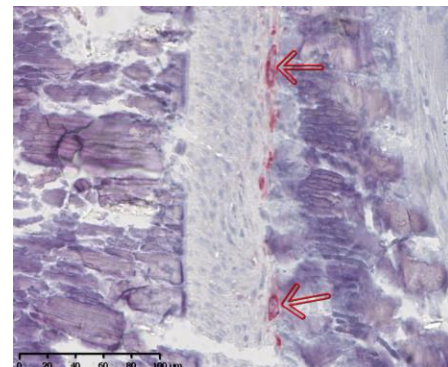


Figure 59 : Marquage TRAP avec contre-coloration autour de l'incisive en site irradié (mandibule de rat non décalcifiée)

6.2.8. Analyses en microscopie électronique à balayage (MEB)

La surface de chaque bloc destiné à l'analyse en MEB est polie à l'aide de disques abrasifs de granulométrie décroissante sur une polisseuse Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff IL, USA).

Ils sont ensuite séchés à l'air comprimé pour ne pas les rayer et métallisés au carbone (métalliseur Jeol ® JEE-4B, Japon (figures 60 et 61)).



Figure 60 : Métalliseur carbone



Figure 61 : Mise en place des échantillons sous la mine carbone pour la métallisation

Les blocs seront observés au microscope électronique à balayage (figure 62) à l'aide d'électrons rétrodiffusés (Leo 1450 VP, Zeiss, Allemagne). Une image de chaque échantillon au grossissement 20 sera enregistrée.

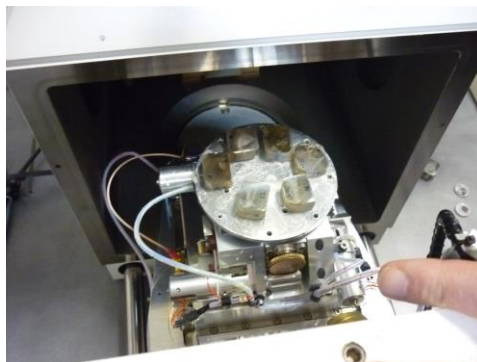


Figure 62 : Mise en place des échantillons métallisés au carbone dans le MEB

6.2.9. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Prism ®, en appliquant la loi de Mann et Whitney avec $p < 0,05$.

6.3. Résultats

6.3.1. Altération de la cicatrisation

Suite à l'euthanasie des sujets et au prélèvement des mandibules, les sujets ayant subi une avulsion des 2^e molaires gauches présentaient des différences de cicatrisation entre le groupe témoins et les groupes irradiés (35 Gy et 50 Gy). Les groupes irradiés montraient un retard de cicatrisation net (figure 63).

L'analyse au micro-scanner a confirmé que la cicatrisation osseuse était altérée pour les groupes irradiés (figure 64).

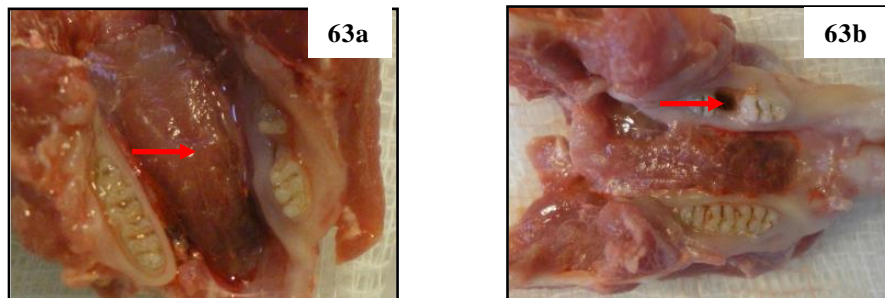


Figure 63 : Comparaison de la cicatrisation post extraction (photos)

63a : Mandibule de rat non irradié 6 semaines après extraction : Cicatrisation muqueuse complète.

63b : Mandibule de rat irradié à 35 Gy 6 semaines après extraction : Cicatrisation alvéolaire et muqueuse incomplète, alvéole vide.

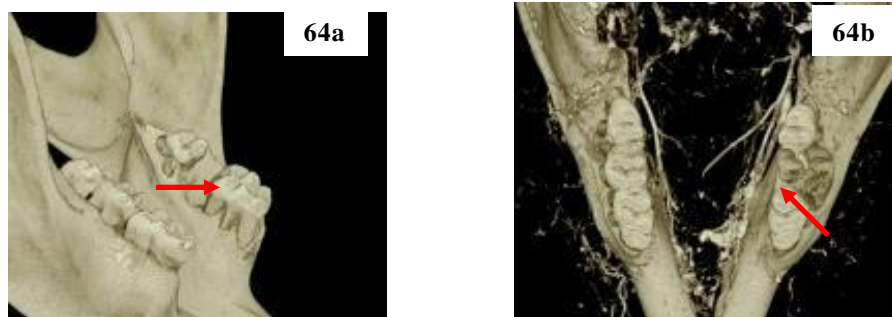


Figure 64 : Comparaison de la cicatrisation post extraction (μ CT)

64a : Mandibule de rat non irradié 6 semaines après extraction : Cicatrisation alvéolaire complète

64b : Mandibule de rat irradié à 50 Gy 6 semaines après extraction : Cicatrisation osseuse incomplète, alvéole irrégulière et incomplètement comblée.

6.3.2. Arrêt de la croissance des incisives en site irradié

Lors de l'euthanasie des sujets, il a également été constaté une différence entre la taille des incisives maxillaires et mandibulaires. Comme vu précédemment, la croissance des incisives des rongeurs est constante. Chez les sujets irradiés la croissance des incisives mandibulaire (zone irradiée) est stoppée (figure 65). Les incisives maxillaires, quant à elles, sont anormalement grandes. Il est possible que les incisives maxillaires atteignent cette taille car elles n'ont plus d'antagoniste pour les user et les maintenir à leur taille habituelle.

L'analyse histologique a révélé une minéralisation pulpaire, plus ou moins prononcée, des incisives mandibulaires en site irradié (figure 66). Cela pourrait expliquer le déficit de croissance de ces dents. Il conviendrait cependant de réaliser des coupes longitudinales des mandibules afin d'observer le site d'où naissent les incisives mandibulaires.

Par ailleurs, les coupes histologiques ont mis en évidence une désorganisation cellulaire chez les sujets irradiés. Une perte de la structure en palissade des améloblastes a été observée (figure 67). Cette désorganisation était fréquente mais inconstante.

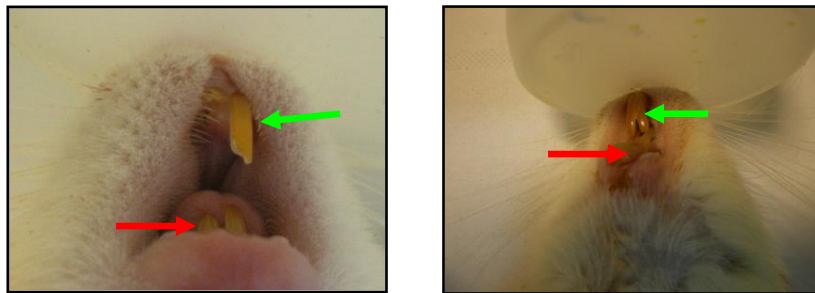


Figure 65 : Incisives des rats irradiés à 50 Gy

Raccourcissement des incisives mandibulaires (flèches rouges) et allongements des incisives maxillaires (flèches vertes).

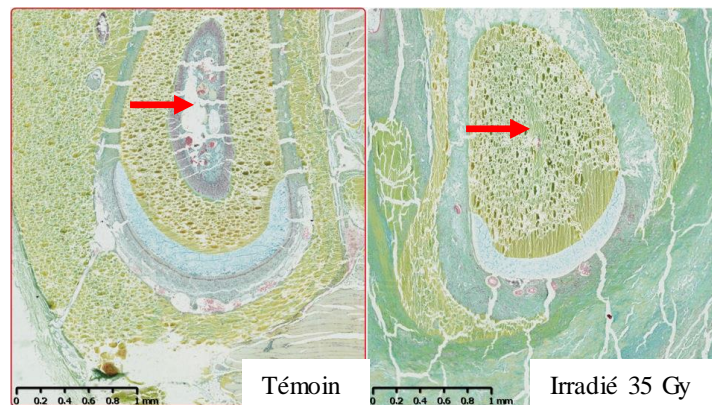


Figure 66 : Minéralisation de la pulpe incisive en site irradié (MOVAT)

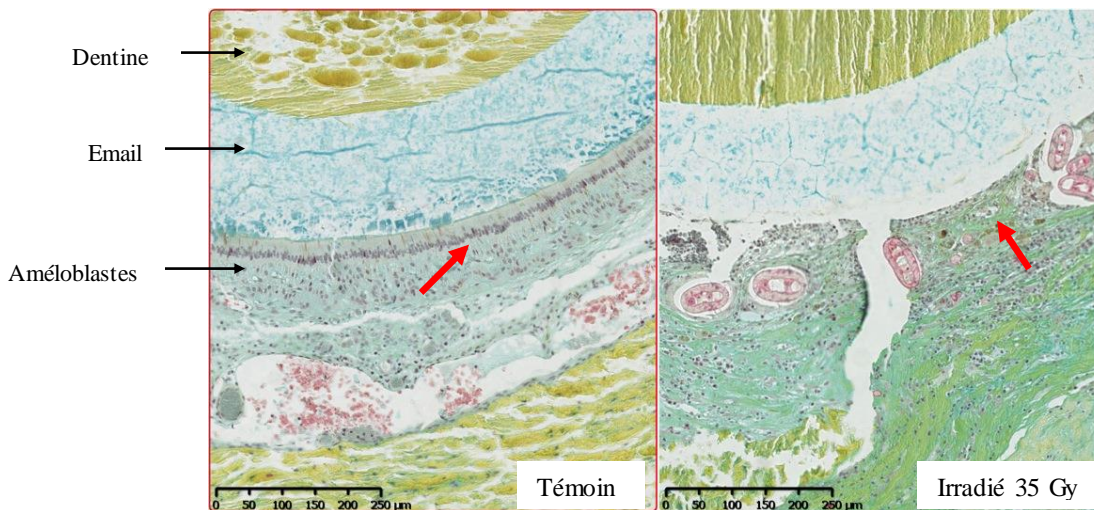


Figure 67 : Désorganisation cellulaire : perte de la structure en palissade des améloblastes

6.3.3. Altération de la moelle osseuse

Une fibrose de la moelle osseuse est visible sur les coupes histologiques. La coloration à l'hématoxyline-éosine met bien en évidence l'augmentation du nombre d'adipocytes au sein de la moelle chez les sujets irradiés (figure 68). La déplétion cellulaire médullaire est également clairement mise en évidence (figure 69). Ce phénomène a déjà été largement décrit dans la littérature [27, 35, 40, 37, 67, 70].

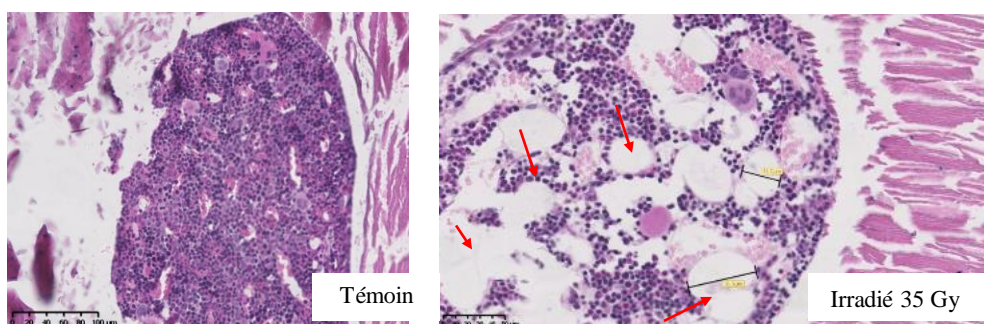


Figure 68 : Fibrose médullaire : augmentation du nombre d'adipocytes suite à l'irradiation (HE)

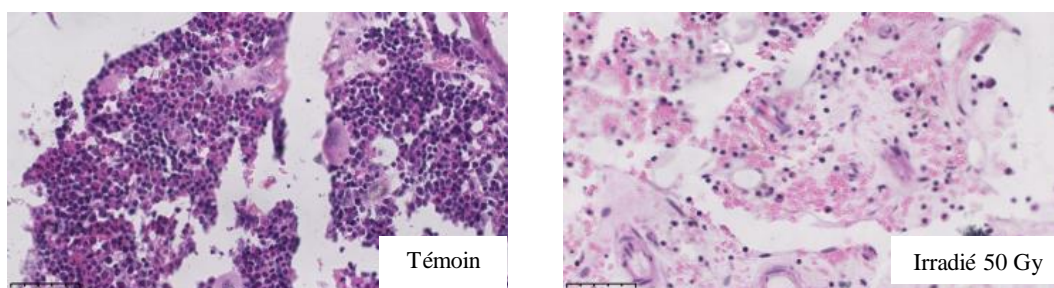


Figure 69 : Fibrose médullaire : raréfaction cellulaire (HE)

6.3.4. Présence d'un défaut osseux basilaire chez les rats irradiés

La reconstruction 3D réalisée grâce au microscanner a révélé un défaut osseux basilaire constant chez les sujets irradiés (figures 70 et 71). Aucun des témoins ne présentait de défaut semblable. Ce défaut est très proche de l'incisive cheminant au sein de la mandibule. Le MEB et les colorations histologiques ont également permis d'observer ce défaut (figures 72, 73 et 74). Cependant, l'observation de la structure osseuse est difficilement observable sur les coupes histologiques en raison des déchirements tissulaires provoqués par la coupe de l'échantillon. Des ostéoclastes ont néanmoins été observés à proximité du défaut (figure 74).



Figure 70 : Défaut osseux basilaire : vue inférieure (micro-scanner)

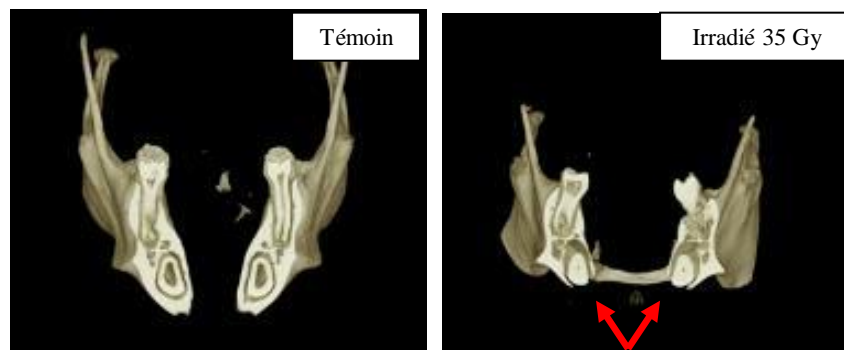


Figure 71 : Défaut osseux basilaire : coupe frontale (microscanner)

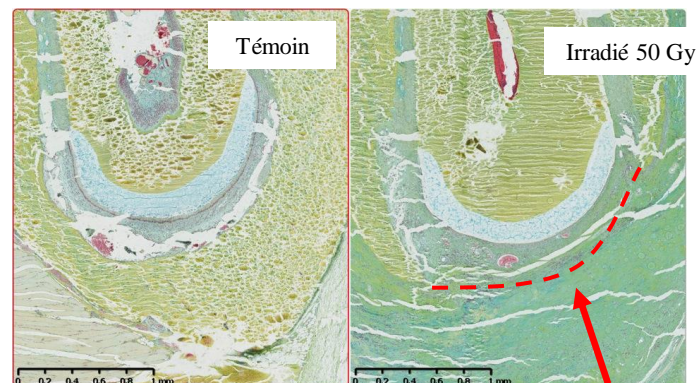


Figure 72 : Défaut osseux basilaire : coupe frontale
(MOVAT, mandibule de rat non décalcifiée)

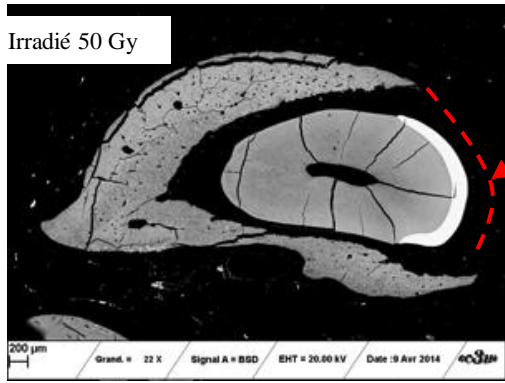


Figure 73 : Défaut osseux basilaire : coupe frontale (MEB)

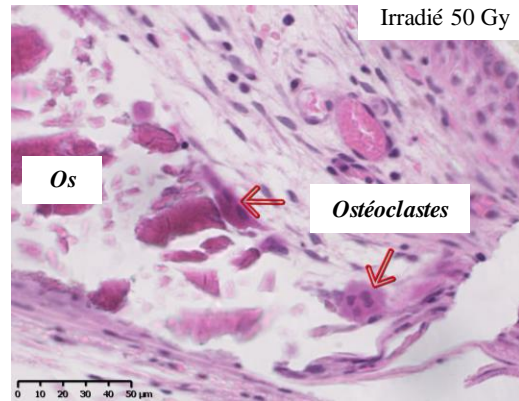


Figure 74 : Présence d'ostéoclastes à proximité du défaut osseux

(HE, mandibule de rat non décalcifiée)

6.3.5. Autres altérations de la structure osseuse

Le MEB a permis de mettre en évidence l'altération osseuse consécutive à l'irradiation. L'os présente un aspect « dentelé », marquant des zones de nécrose (figure 75).

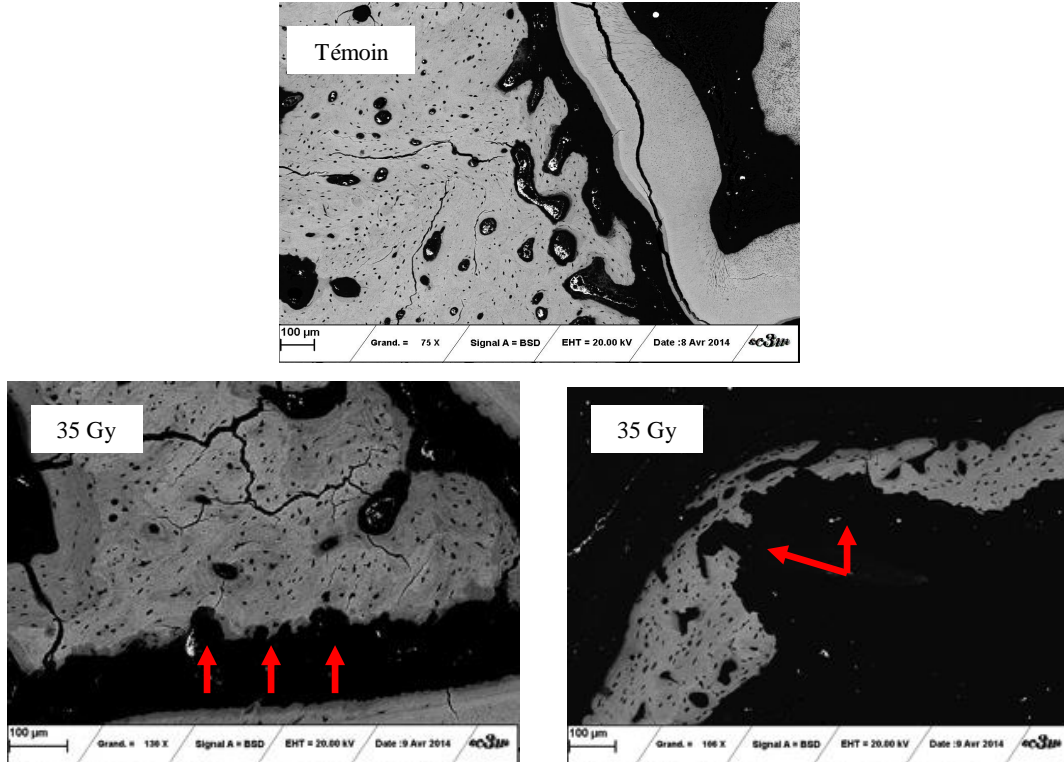


Figure 75 : Altération de l'os suite à irradiation

Témoin : Bords osseux lisses et réguliers
Sujets irradiés : Bords osseux déchiquetés, aspect de « dentelle »

6.3.6. Augmentation de l'activité ostéoclastique

La mise en évidence de la TRAP a montré une recrudescence de l'activité ostéoclastique chez les sujets irradiés, en particulier au niveau du défaut osseux basilaire (figure 76) et des alvéoles extraites (figures 77 et 78)

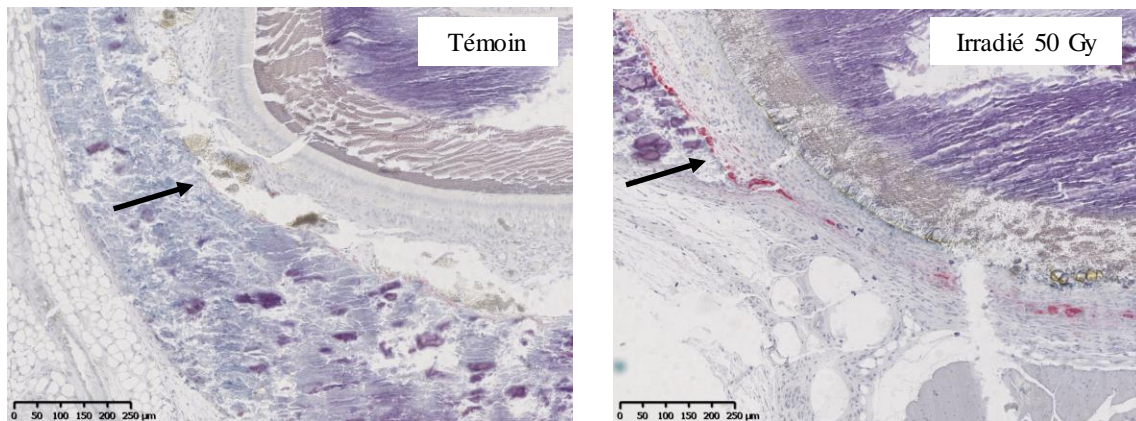


Figure 76 : Augmentation de l'activité ostéoclastique au niveau du défaut basilaire

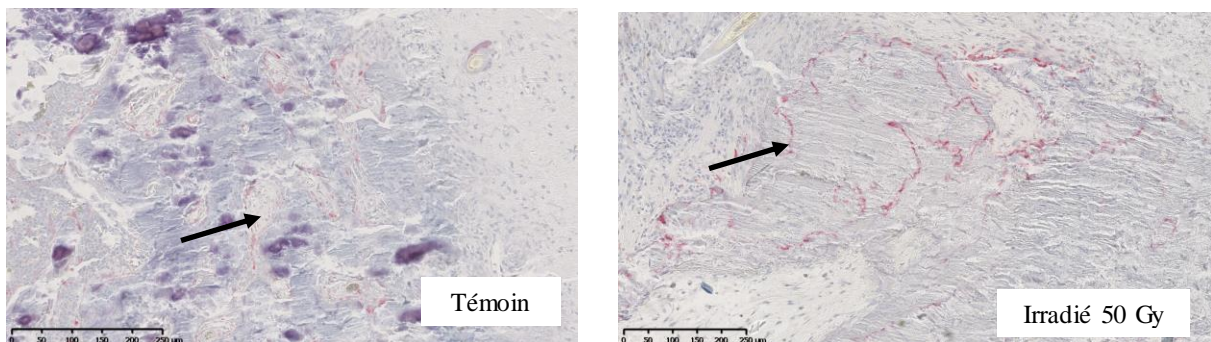


Figure 77 : Augmentation de l'activité ostéoclastique au niveau d'une alvéole extraite

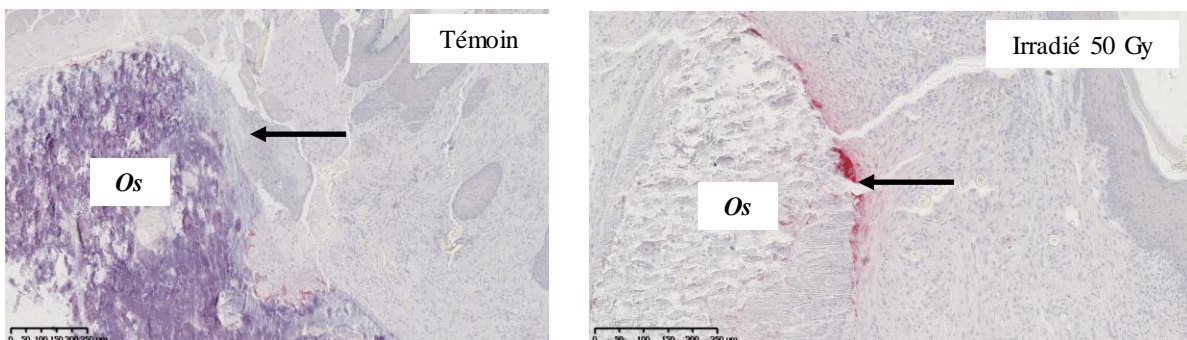


Figure 78 : Augmentation de l'activité ostéoclastique au niveau d'une alvéole extraite

6.3.7. Effet des rayonnements ionisants sur les éléments microvasculaires

6.3.7.1. Résultats qualitatifs

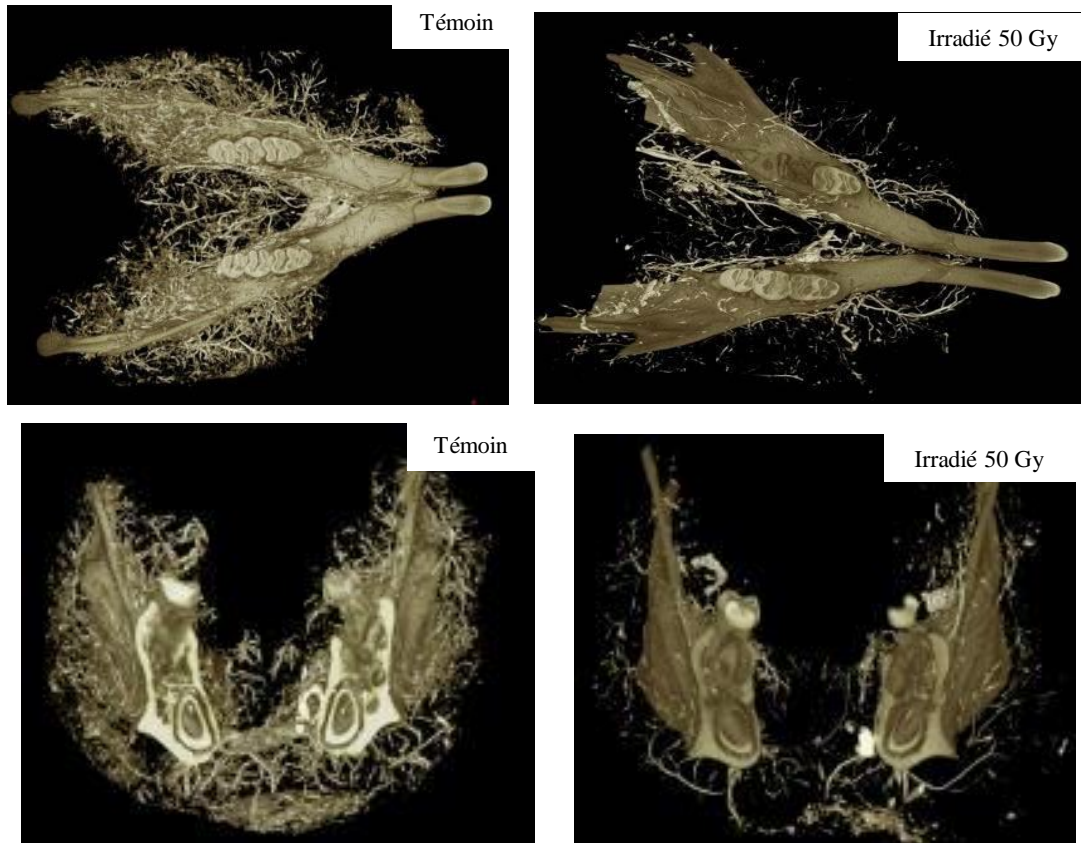


Figure 79 : Vascularisation mandibulaire. Reconstruction 3D au micro scanner

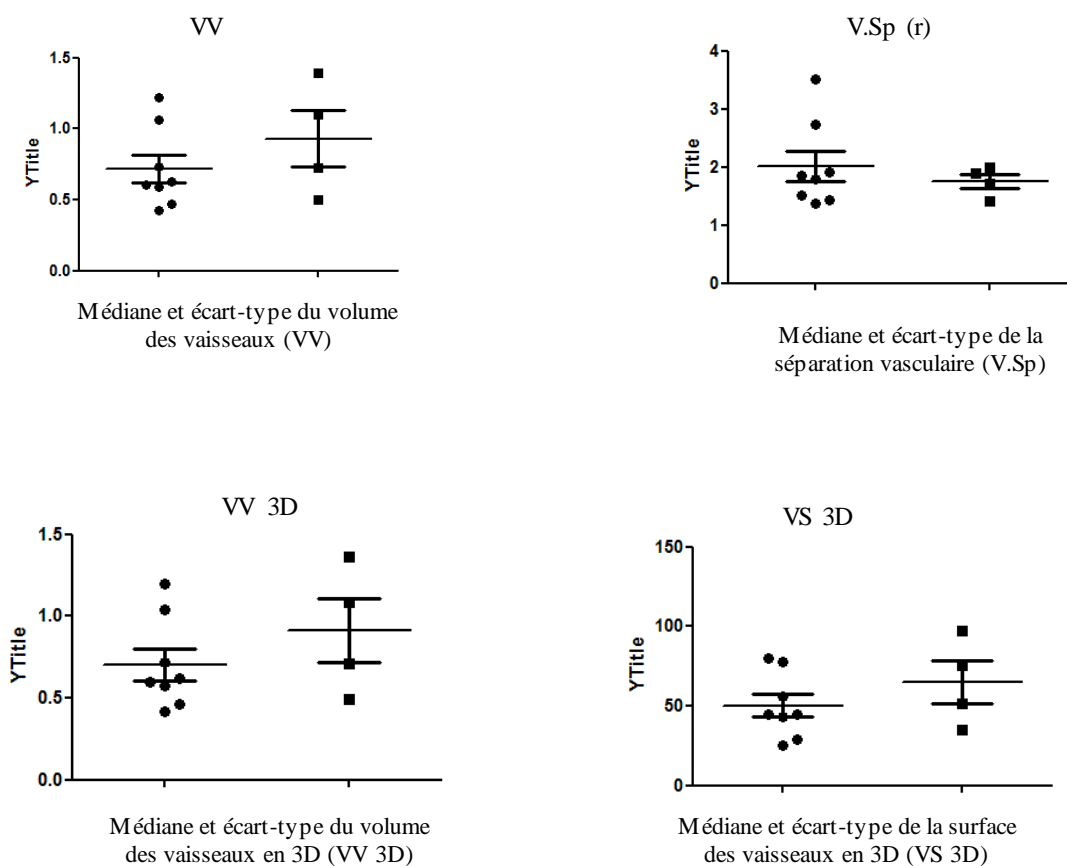
La comparaison qualitative des images entre témoins et sujets irradiés semble mettre en évidence une altération de la microvascularisation. Le réseau semble beaucoup moins dense chez les animaux irradiés (figure 79).

6.3.7.2. Résultats quantitatifs

	Médiane ORN	Ecart-type ORN	Médiane Témoin	Ecart-type Témoin
Vessel volume	0,7163188	0,2628363	0,9292275	0,3948496
Tissue surface	889,00236	224,55926	890,04656	238,35572
Vascular thickness (plate model)	0,0473875	0,0083773	0,0232175	0,0003937
Vascular separation (plate model)	60,469021	37,730174	45,13689	11,985305
Vascular diameter (rod model)	0,0473863	0,0055835	0,0464275	0,0007889
Vascular separation (rod model)	2,065145	0,7386419	1,75539	0,2555241
Vessel volume	0,7036088	0,2760625	0,913085	0,3880532
Vessel surface	50,109379	20,146194	64,90304	27,145314

Figure 80 : Tableau récapitulatif des résultats concernant les paramètres de microvascularisation

- Rat irradié
- Rat Témoin



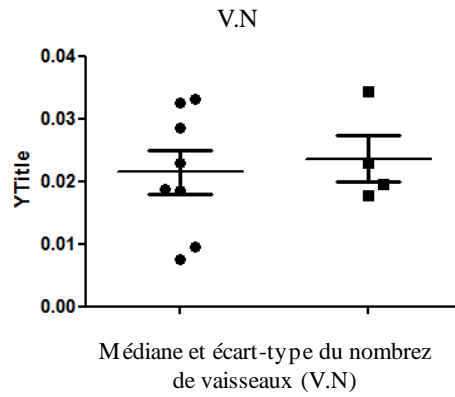


Figure 81 : Significativité des résultats

Le micro scanner montre une altération des paramètres vasculaires dans le groupe irradié. Le Volume Vasculaire (VV, VV 3D), le nombre (VN) et la surface (VS 3D) des vaisseaux sont diminués. La séparation entre les vaisseaux est augmentée (VSp). Ces résultats vont dans la direction attendue mais ne sont pas significatifs.

6.4. Discussion

La quantification vasculaire réalisée avec le micro scanner n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative sur la quantification du réseau microvasculaire entre le groupe irradié et le groupe non irradié. Néanmoins, malgré leur manque de significativité, les résultats montrent une tendance à la baisse pour le groupe irradié.

D'autres équipes [38, 55] ont mis en évidence une telle différence avec un micro scanner. La littérature évoque depuis longtemps l'atteinte microvasculaire consécutive à une irradiation à dose thérapeutique [12, 70, 110]. Les résultats de ces équipes et les nôtres sont cohérents avec l'analyse de la littérature.

Différents biais ont pu intervenir au cours de cette étude et expliquer le manque de significativité des résultats obtenus. Les coupes histologiques montraient des vaisseaux de taille variable vides. L'intégralité de l'arbre vasculaire n'était donc pas injectée de sulfate de baryum. Les paramètres d'injection (pression de la pompe, vitesse d'injection) et la composition de la solution de produit de contraste (viscosité) sont éventuellement à revoir afin de permettre une plus grande pénétration du produit de contraste dans les microvaisseaux. De plus la définition des volumes d'intérêt (limites osseuses des mandibules avec les dents) a été réalisée par un seul opérateur de manière manuelle. La sélection du seuillage, délicate comme décrit précédemment, a également pu biaiser le résultat. L'analyse de la microvascularisation avec le microscanner est réalisée à l'aide d'un algorithme originalement mis au point pour l'analyse de la microarchitecture osseuse [74]. Cependant, le réseau vasculaire ne présente pas la même organisation spatiale que le réseau trabéculaire osseux. Ce type d'algorithme est-il vraiment adapté à l'étude et à la quantification microvasculaire ? En outre, les résultats montrent un écart-type important qui pourrait s'expliquer par le manque de puissance de l'étude (n=19).

Néanmoins, la manipulation réalisée nous a permis de valider le modèle ORN mis au point. Les éléments attendus ont été retrouvés via les différentes techniques. Les sujets irradiés présentaient une nette atteinte médullaire sur les coupes histologiques (fibrose). La structure osseuse était altérée tant au micro scanner qu'au MEB (défauts osseux, os déchiqueté d'aspect nécrotique). L'hypocellularité osseuse n'a pas pu être étudiée histologiquement, les déchirures de l'os sur les coupes ne l'ayant pas permis.

Les protocoles d'immunohistochimie CD31 et de TRAP sur résine Technovit® ont été validés. Cela a permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité ostéoclastique sur les sites d'extraction chez les rats irradiés.

Les différentiels de tension entre les différents tissus mandibulaires lors des coupes ont entraîné des déchirures tissulaires (en particulier au sein de l'os). Néanmoins, les analyses ont pu être réalisées sur coupes osseuses non décalcifiées.

Les perspectives ouvertes par le microscanner et la qualité des images obtenues poussent à poursuivre dans cette voie. L'étude continue actuellement avec une deuxième série de sujets. L'augmentation du nombre de sujets permettra peut être de diminuer l'écart-type et d'obtenir des résultats significatifs.

7. CONCLUSION

Les résultats obtenus n'ont pas mis en évidence de différence significative d'un point de vue quantitatif entre le réseau microvasculaire du groupe irradié et celui du groupe témoin. L'absence de résultat significatif n'est pas synonyme d'absence de différence, et les biais ont été discutés précédemment. L'atteinte vasculaire radio-induite est reconnue depuis longtemps [§5.3.] et les études récentes l'ont confirmé [26, 38, 55].

Suivant ce constat, de nouvelles thérapeutiques de prévention et de traitement de l'ostéoradionécrose sont envisagées. Certaines équipes se sont intéressées à des thérapeutiques pro-angiogéniques (déféroxamine et hormone parathyroïde) afin de diminuer l'atteinte vasculaire osseuse radio-induite [38, 55]. A ce jour, les résultats semblent prometteurs. Mais la diminution de l'atteinte vasculaire diminue-t-elle les complications osseuses tardives ? Ces études sont au stade préclinique et leur pertinence et leur application chez l'homme reste encore à démontrer. Cependant de telles thérapeutiques pourraient, éventuellement, permettre de prévenir les complications osseuses radio-induites tardives, par exemple lors d'extractions dentaires chez les patients irradiés.

Les études pourraient également permettre le développement de nouveaux biomatériaux afin de répondre à ces situations cliniques spécifiques. Il serait possible d'imaginer de rendre moins mutilantes des thérapeutiques telles que la chirurgie resectrice mandibulaire.

Ce ne sont ici encore que des pistes à explorer. Néanmoins, les développements techniques constants ainsi que l'approfondissement des connaissances actuelles, ouvre le champ des possibles. Les possibilités thérapeutiques qui pourraient en découler sont engageantes.

8. BIBLIOGRAPHIE

1. Aitasalo K. Effect of irradiation on early enzymatic changes in healing mandibular periosteum and bone. A histochemical study on rats. *Acta Radiol Oncol* 1986 ; 25 : 207–212.
2. Al-Nawas B, Duschner H, Grötz KA. Early cellular alterations in bone after radiation therapy and its relation to osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2004 ; 62 : 1045.
3. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol* 2014 ; 35 : 32–37.
4. Arkudas A, Beier JP, Prymachuk G, et al. Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue Eng Part C Methods* 2010 ; 16 : 1503–1514.
5. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999 ; 85 : 221–228.
6. Barbet J-P. Les tissus minéralisés, Cours PCEM1, Faculté de Médecine de Cochin Port-Royal. <http://lhec.teso.net>
7. Barou O, Mekraldi S, Vico L, et al. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. *Bone* 2002 ; 30 : 604–612.
8. Battaglia S. Application de l'imagerie par rayons X au petit animal. 2012 <http://www.santé.univ-nantes.fr>
9. Bentley MD, Ortiz MC, Ritman EL, et al. The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents. *Am J Physiol - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2002 ; 282 : R1267–R1279.
10. Berger A, Bensadoun R-J. Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: the mandible. *Cancer Radiother* 2010 ; 14 : 295–300.
11. Bianco P, Sacchetti B, Riminucci M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011 ; 24 : 37–47.
12. Bras J, Jonge HKT de, Merkesteyn JPR van. Osteoradionecrosis of the mandible: Pathogenesis. *Am J Otolaryngol* 1990 ; 11 : 244–250.
13. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003 ; 425 : 841–846.
14. Cao X, Wu X, Frassica D, et al. Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011 ; 108 : 1609–1614.
15. Caoui M. Effets biologiques des radiations ionisantes. Cours de l'Université Mohammed V de Souissi, 2009 http://www.jamiati.ma/Cours_En_Ligne/Documents/effets.pdf

16. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 2003 ; 8 : 980–989.
17. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003 ; 9 : 653–660.
18. Carulli C, Innocenti M, Brandi ML. Bone vascularization in normal and disease conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013 ; 4 : 106.
19. Cohen M, Nishimura I, Tamplen M, et al. Animal model of radiogenic bone damage to study mandibular osteoradionecrosis. *Am J Otolaryngol* 2011 ; 32 : 291–300.
20. Dambraïn R. La pathologie de l'ostéoradionécrose. *Rev Stomatol Maxillofac* 1993 ; 97 : 140–7.
21. Davarpanah M, Moncler SS. Manuel d'implantologie clinique: Concepts, protocoles et innovations récentes. Paris : Wolters Kluwer France, 2008 : 566.
22. Delanian S, Lefaix JL. Radionécrose de l'os mature : connaissance physiopathologique récente motrice d'une thérapeutique médicale innovante. *Cancer Radiother* 2002 ; 6 : 1–9.
23. Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* 2004 ; 73 : 119–131.
24. Delanian S, Lefaix JL. Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol* 2007 ; 17 : 99–107.
25. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury – a complex “wound.” *Radiother Oncol* 2002 ; 63 : 129–145.
26. Deshpande SS, Donneys A, Farberg AS, et al. Quantification and characterization of radiation-induced changes to mandibular vascularity using micro-computed tomography. *Ann Plast Surg* 2014 ; 72 : 100–103.
27. D'Hautuille C. Création d'un modèle animal d'ostéoradionécrose. Mémoire : Master 2, Sciences chirurgicales, Paris XI et XII, 2008.
28. Dörr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001 ; 61 : 223–231.
29. Drouet F, Lagrange JL. Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: bone marrow. *Cancer Radiother* 2010 ; 14 : 392–404.
30. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2000 ; 106 : 1049–1061.
31. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, et al. Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 ; 287 : H302–310.

32. Ehling J, Theek B, Gremse F, et al. Micro-CT Imaging of Tumor Angiogenesis: Quantitative Measures Describing Micromorphology and Vascularization. *Am J Pathol* 2014 ; 184 : 431– 441.
33. European Intergovernmental Research Organisations, European Synchrotron Radiation Facility. http://www.eiroforum.org/media/photo_galleries/esrf/index.html
34. Ellis SL, Grassinger J, Jones A, et al. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* 2011 ; 118 : 1516–1524.
35. El-Naggar AM, Hanna IR, Chanana AD, et al. Bone marrow changes after localized acute and fractionated X irradiation. *Radiat Res* 1980 ; 84 : 46–52.
36. Evans HB, Brown S, Hurst LN. The effects of early postoperative radiation on vascularized bone grafts. *Ann Plast Surg* 1991 ; 26 : 505–510.
37. Fajardo LF. The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol* 2005 ; 44 : 13–22.
38. Farberg AS, Jing XL, Monson LA, et al. Deferoxamine reverses radiation induced hypovascularity during bone regeneration and repair in the murine mandible. *Bone* 2012 ; 50 : 1184–1187.
39. Fei J, Jia F, Peyrin F, et al. Imaging and quantitative assessment of long bone vascularization in the adult rat using microcomputed tomography. *Anat Rec (Hoboken)* 2010 ; 293 : 215– 224.
40. Fenner M, Park J, Schulz N, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg* 2010 ; 38 : 47–53.
41. Fleutot J-B. Les effets des rayonnements ionisants sur la santé. Cours sur la Radioprotection 2009 http://www.rpcirkus.org/site-web/10eme-journee-du-ramip/doc_download/269-radiobioradiopharma
42. Gadeau A-P, Renault M-A. Serimedis : Banque d'image de l'INSERM. <http://www.serimedis.inserm.fr>
43. Garrett RW, Emerson SG. Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 503–506.
44. Gaudy J-F. Anatomie clinique. Paris : Wolters Kluwer France, 2007 : 244.
45. Gaugler M-H. A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *BJR Suppl* 2005 ; 27 : 100–105.
46. Giuvărășteanu I. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts--standard method for studying microvessels. *Rom J Morphol Embryol* 2007 ; 48 : 257–261.

47. Grabherr S, Djonov V, Yen K, et al. Postmortem angiography: review of former and current methods. *Am J Roentgenol* 2007 ; 188 : 832–838.
48. Hanson A. Rat Behavior and Biology : Teeth. 2006 <http://www.ratbehavior.org>
49. Haute Autorité de Santé. Cancer des voies aérodigestives supérieures, Guide affection longue durée. 2009.
50. Jacobson AS, Buchbinder D, Hu K, et al. Paradigm shifts in the management of osteoradionecrosis of the mandible. *Oral Oncol* 2010 ; 46 : 795–801.
51. Jegoux F, Malard O, Goyenvalle E, et al. Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010 ; 109 : 173–184.
52. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-Induced Mandibular Bone Complications. *Cancer Treat Rev* 2002 ; 28 : 65–74.
53. Jing XL, Farberg AS, Monson LA, et al. Radiomorphometric quantitative analysis of vasculature utilizing micro-computed tomography and vessel perfusion in the murine mandible. *Craniofac Trauma Reconstr* 2012 ; 5 : 223–230.
54. Kamina P. Anatomie clinique. Tome 2. Paris : Maloine, 2006.
55. Kang SY, Deshpande SS, Donneys A, et al. Parathyroid hormone reverses radiation induced hypovascularity in a murine model of distraction osteogenesis. *Bone* 2013 ; 56 : 9–15.
56. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005 ; 121 : 1109–1121.
57. King MA, Casarett GW, Weber DA. A study of irradiated bone: I. histopathologic and physiologic changes. *J Nucl Med* 1979 ; 20 : 1142–1149.
58. Lafage-Proust M-H, Prisby R, Roche B, et al. Bone vascularization and remodeling. *Joint Bone Spine* 2010 ; 77 : 521–524.
59. Langer M, Prisby R, Peter Z, et al. Quantitative investigation of bone microvascularization from 3D synchrotron micro-computed tomography in a rat model. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009 ; 2009 : 1004–1007.
60. Langman J. Abrégé d'embryologie médicale: Développement humain, normal et pathologique. Paris : Masson, 1976 : 455.
61. Laroche M. Circulation intraosseuse : de la physiologie à la pathologie. *Rev Rhum* 2002 ; 69 : 484–491.
62. Lartigau E, Dubray B, Mornex F. Biological mechanisms of late effects of ionizing radiations. *Cancer Radiother* 1997 ; 1 : 669–676.

63. Li X-M, Hu Z, Jorgenson ML, et al. High levels of acetylated low-density lipoprotein uptake and low tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2 (Tie2) promoter activity distinguish sinusoids from other vessel types in murine bone marrow. *Circulation* 2009 ; 120 : 1910–1918.
64. Lu W, Dong Z, Liu Z, et al. Detection of microvasculature in rat hind limb using synchrotron radiation. *J Surg Res* 2010 ; 164 : e193–199.
65. Lunde OC. Méthode endoscopique de mesure de flux par laser Doppler. *Acta Endosc* 1990 ; 20 : 5–10.
66. Lyons A, Ghazali N. Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of its pathophysiology and treatment. *B J Oral and Maxillofac Surg* 2008 ; 46 : 653–660.
67. Maeda M, Bryant MH, Yamagata M, et al. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes. A biomechanical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 1988 ; 70 : 392–399.
68. Marieb EN. Anatomie et physiologie humaine. Bruxelles : De Boeck, 1993.
69. Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* 1983 ; 41 : 283–288.
70. Marx RE. A new concept in the treatment of osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 1983 ; 41 : 351–357.
71. Marxen M, Thornton MM, Chiarot CB, et al. MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging. *Med Phys* 2004 ; 31 : 305–313.
72. Meyer I. Infectious diseases of the jaws. *J Oral Surg* 1970 ; 28 : 17–26.
73. Milliat F, François A, Tamarat R, et al. Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2008 ; 57 : 139–148.
74. Mondy WL. Data acquisition for modeling and visualization of vascular tree, Thèse de PhD, University of South Florida, Department of Chemical and Biomedical Engineering, 2009.
75. Okunieff P, Wang X, Rubin P, et al. Radiation-induced changes in bone perfusion and angiogenesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998 ; 42 : 885–889.
76. Pan D, Caruthers SD, Hu G, et al. Ligand-Directed Nanobialys as Theranostic Agent for Drug Delivery and Manganese-Based Magnetic Resonance Imaging of Vascular Targets. *J Am Chem Soc* 2008 ; 130 : 9186–9187.
77. Pannarale L, Morini S, D’Ubaldo E, et al. SEM corrosion-casts study of the microcirculation of the flat bones in the rat. *Anat Rec* 1997 ; 247 : 462–471.
78. Parfitt AM. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone* 2000 ; 26 : 319–323.

79. Phulpin B. Modélisation de dégénérescence tissulaire radio-induite et conceptualisation de réhabilitation des tissus irradiés par thérapie cellulaire. Thèse de doctorat, BioSE - Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement, Nancy, 2011.
80. Pitkänen MA, Hopewell JW. Functional changes in the vascularity of the irradiated rat femur. Implications for late effects. *Acta Radiol Oncol* 1983 ; 22 : 253–256.
81. Poirier J, Dumas J-LR. Atlas d'histologie: Travaux pratiques. Paris : Masson, 1983 : 127.
82. Purton LE, Scadden DT. The hematopoietic stem cell niche. 2008 ; <http://www.stembook.org/node/518>
83. Quesnel B. Niches hématopoïétiques et cellules souches. *Encycl Med Chir (Paris), Hématologie* 2012 ; 7 : 1–9.
84. Ramuz O, Bourhis J, Mornex F. Late effects of radiations on mature and growing bone. *Cancer Radiother* 1997 ; 1 : 801–809.
85. Raoul G, Maes J-M, Pasquier D, et al. Ostéoradionécroses des maxillaires (maxillaire et mandibulaire). *Encycl Med Chir (Paris), Stomatologie* 2005 ; 1 : 255–276.
86. Régaud C. Sur la sensibilité du tissu osseux normal vis à vis des rayons X et gamma et sur le mécanisme de l'ostéoradionécrose. *Soc Biol* 1922 ; 87 : 629–32.
87. Roche B. Mise au point de l'évaluation structurelle et fonctionnelle de la vascularisation d'un os long chez la souris. Validation des des modèles de perte osseuse. Thèse de Doctorat : Spécialité Biologie moléculaire et cellulaire, St Etienne, 2013.
88. Roche B, David V, Vanden-Bossche A, et al. Structure and quantification of microvascularisation within mouse long bones: what and how should we measure? *Bone* 2012 ; 50 : 390–399.
89. Rouge M. Dental Anatomy of Rodents. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/pregastric/rodentpage.html>
90. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007 ; 131 : 324–336.
91. Sanofi-Aventis. Anatomie et Histologie d'une Artère. <http://www.tensiometre.net>
92. Sargos P, Mamou N, Dejean C, et al. Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : l'os chez l'adulte. *Cancer Radiother* 2010 ; 14 : 386–391.
93. Schneider P, Krucker T, Meyer E, et al. Simultaneous 3D visualization and quantification of murine bone and bone vasculature using micro-computed tomography and vascular replica. *Microsc Res Tech* 2009 ; 72 : 690–701.
94. Sherwood L. Physiologie humaine. Bruxelles : De Boeck Supérieur, 2006 : 774.

95. Silberstein LE, Lin CP. A new image of the hematopoietic stem cell vascular niche. *Cell Stem Cell* 2013 ; 13 : 514–516.
96. Stevens A, Lowe J. *Histologie humaine*. Bruxelles : De Boeck Supérieur, 1997 : 422
97. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, et al. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003 ; 4 : 529–536.
98. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol* 2005 ; 26 : 426–433.
99. Sugimoto M, Takahashi S, Toguchida J, et al. Changes in bone after high-dose irradiation. Biomechanics and histomorphology. *J Bone Joint Surg Br* 1991 ; 73 : 492–497.
100. Suva LJ. Imaging the vasculature by microCT; ain't no bones about it. *Bone* 2012 ; 50 : 400.
101. Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y, et al. Long-term changes in the haversian systems following high-dose irradiation. An ultrastructural and quantitative histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 1994 ; 76 : 722–738.
102. Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, et al. Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011 ; 145 : 404–410.
103. Trichet V. Imagerie “petit animal.” 2013; <http://www.santé.univ-nantes.fr>
104. Verant P, Serduc R, Coles JA, et al. A method for measuring cerebral blood volume of mouse using multiphoton laser scanning microscopy. *Proc SPIE* 2004 ; 5463 : 1–12.
105. Wang H, Zhang P, Liu L, et al. Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013 ; 85 : 1–8.
106. Wang L, Benedito R, Bixel MG, et al. Identification of a clonally expanding haematopoietic compartment in bone marrow. *EMBO J* 2013 ; 32 : 219–230.
107. Watson W, Scarborough J. Osteoradionecrosis in intraoral cancer. *Am J Roentgenol* 1938 ; 40 : 524–34.
108. Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. *Eur Radiol* 2006 ; 16 : 619–633.
109. Xie XT, Qiu WL, Yuan WH, Wang ZH. Experimental study of radiation effect on the mandibular microvasculature of the guinea pig. *Chin J Dent Res* 1998 ; 1 : 46–51.
110. Yang J, Yu LX, Rennie MY, et al. Comparative structural and hemodynamic analysis of vascular trees. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 2010 ; 298 : H1249–1259.
111. Zagorchev L, Mulligan-Kehoe MJ. Molecular imaging of vessels in mouse models of disease. *Eur J Radiol* 2009 ; 70 : 305–311.

112. Zagorchev L, Oses P, Zhuang ZW, et al. Micro computed tomography for vascular exploration. *J Angiogenes Res* 2010 ; 2 : 7.
113. Zhuang Q, Zhang Z, Fu H, et al. Does radiation-induced fibrosis have an important role in pathophysiology of the osteoradionecrosis of jaw? *Med Hypotheses* 2011 ; 77 : 63–65.
114. Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen Surgery Reference, Mandible <https://www2.aofoundation.org>.

9. ANNEXES

9.1. Protocole d'inclusion en résine Technovit ®

9.1.1. Fixation

Les échantillons sont d'abord fixés dans un milieu composé de paraformaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate durant quatre jours à 4°C.

9.1.2. Déshydratation

Ils sont ensuite déshydratés par passages successifs de 24 heures chacun, dans quatre bains d'éthanol de degré volumique croissant (70°, 80°, 95° et 100°) à 4°C. La fin de la déshydratation se fait dans un bain de xylène pur pendant douze heures.

9.1.3. Imprégnation

L'imprégnation se fait dans quatre bains successifs. La composition de ces bains est détaillée dans le tableau ci-dessous. Le stockage se fait à 4°C pour les quatre solutions. Les trois premiers bains sont de 24h chacun (solutions 1, 2 et 3). Le dernier bain (solution 4) dure 3 à 5 jours, en fonction de la taille des échantillons.

	Xylène	Solution de base stabilisée	Solution de base déstabilisée ¹	PMMA ² en poudre	Hardener 1 ³
<i>Solution 1</i>	50%	50%			
<i>Solution 2</i>		100%			0,50%
<i>Solution 3</i>			100%		0,50%
<i>Solution 4</i>			100%	8%	0,50%

9.1.4. Inclusion

La solution d'inclusion se compose de deux autres solutions (Poly A et Poly B). Leur composition est détaillée ci-dessous (pour 40ml de solution d'inclusion). Il faut préparer neuf volumes de Poly A pour un volume de Poly B.

	Solution de base déstabilisée	PMMA en poudre	Hardener 1	Hardener 2 ⁴	Régulateur ⁵
<i>Poly A</i>	36 ml	5,76 g	0,216 g		
<i>Poly B</i>	4 ml			320 µl	160µl

¹ Solution de base déstabilisée : Solution stabilisée passée au travers de billes d'oxyde d'aluminium.

² PMMA : Poly (MétylMéthacrylate)

³ Hardener 1 : Dibenzoylperoxyde sous forme de poudre

⁴ Hardener 2 : Tétraméthyaniline sous forme liquide

⁵ Régulateur : Canthiol

Les deux solutions sont préparées de manière séparée, la veille de l'inclusion, et placées à -20°C jusqu'à refroidissement complet. Cette manœuvre a pour but d'éviter la polymérisation lors de l'étape du vide.

Le jour de l'inclusion, les moules d'inclusion sont préparés. Il s'agit de piluliers en verre, de contenance adaptée à la taille de l'échantillon avec un couvercle adapté. Avant de placer les échantillons dans les moules, un fond de résine Technovit ® préalablement polymérisé et coupé (épaisseur de 2 mm) est placé au fond des piluliers. Il s'agit d'avoir de la résine autour de l'intégralité de l'échantillon.

Quand les échantillons sont déposés et centrés selon l'orientation voulue dans les moules, les solutions Poly A et Poly B sont mélangées et le milieu d'inclusion ainsi préparé est versé dans les moules.

Les échantillons sont ensuite placés dix minutes sous une cloche à vide afin d'éliminer les bulles d'air.

Par la suite, les piluliers sont remplis au maximum et fermés. Ils sont placés à -20°C durant plusieurs jours, jusqu'à polymérisation complète.

Une fois polymérisés, les piluliers sont placés à 4°C pendant au moins une heure, puis à température ambiante. L'augmentation de température doit être progressive.

Dès que les échantillons sont à température ambiante les piluliers sont brisés avec un marteau et le bloc de résine récupéré.

Résumé des étapes d'inclusion

Etape	Réactifs	Temps	Stockage
FIXATION	Formol neutre 1/9 tamponné phosphate pH 7,2	4 jours ou plus	4°C
DESHYDRATATION	Ethanol 70 Ethanol 80 Ethanol 95 Ethanol 100 Xylène	1 jour 1 jour 1 jour 1 jour 0,5 jour	4°C 4°C 4°C 4°C 4°C
IMPREGNATION	Solution 1 Solution 2 Solution 3 Solution 4	1 jour 1 jour 1 jour 3 à 5 jours	4°C 4°C 4°C 4°C
INCLUSION	Mix Poly A et Poly B	7 jours	20°C

9.2. Coloration au pentachrome de MOVAT

Etape	Produits	Durée d'incubation
DEPLASTIFICATION	Acétone	5 min
	Acétone	5 min
	Eau distillée	5 min
	Eau distillée	5 min
COLORATION	Bleu Alcian	30 min
	Eau courante	5 min
	Ethanol alcalin	60 min
	Eau courante	10 min
	Eau distillée	rinçage
	Hématoxyline ferrique de Weigert	20-30 min
	Eau courante	15 min
	Eau distillée	rinçage
	Brillant de Crocein / Fushine acide	10 min
	Acide acétique 0,5%	rinçage
	Acide Phosphotungstique 5 %	20 min
	Acide acétique 0,5%	2 min
	Ethanol 100%	5 min
	Ethanol 100%	5 min
	Ethanol 100%	5 min
Safran du Gatinais	15 min	
Montage	Ethanol 100%	1 min
	Ethanol 100%	1 min
	Ethanol 100%	1 min
	MCH ⁶	1 min
	MCH	1 min
	MCH	1 min

Une fois colorées, les coupes sont montées entre lame et lamelle et collées à l'aide d'une colle de montage Eukitt (Labo Nord, Villeneuve d'Asq, France) pour ensuite être observées au microscope photonique.

Cette coloration permet essentiellement de montrer :

- les fibres de collagène en jaune,
- le cytoplasme en rouge,
- le cartilage calcifié en bleu-vert,
- le tissu ostéoïde en rouge,
- l'os et le cartilage en jaune brillant.

⁶ MCH : MéthylCycloHexane

9.3. Coloration à l'hématoxyline-éosine

Etape	Produits	Durée d'incubation
DEPLASTIFICATION	Acétone	5 min
	Acétone	5 min
	Eau courante	3 min
	Eau distillée	1 min
COLORATION	Hématoxyline de Weigert	30 min
	Eau courante	2 min
	Alcool chlorhydrique	10 sec
	Eau courante	2 min
	Carbonate de lithium	1 min
	Eau courante	2 min
	Eau distillée	1 min
	Eosine- Erythrosine	3 min
	Eau courante	10 sec
	Alcool 95%	15 sec
MONTAGE	Alcool 100%	1 min
	Alcool 100%	1 min
	Alcool 100%	1 min
	MCH	1 min
	MCH	1 min
	MCH	1 min

Une fois colorées, les coupes sont montées entre lame et lamelle et collées à l'aide d'une colle de montage Eukitt (Labo Nord, Villeneuve d'Asq, France) pour ensuite être observées au microscope photonique.

Cette coloration permet essentiellement de montrer :

- les noyaux en bleu-noir
- l'os minéralisé jeune en vert-jaune (plutôt vert)
- l'os minéralisé vieux en jaune-vert (plutôt jaune)
- le collagène en jaune
- le cartilage en bleu-vert
- le muscle et la fibrine en rouge
- les composants non cellulaires de la matrice extra cellulaire en bleu ciel

9.4. Protocole d'immunohistochimie : marquage CD31

Etape	Produits	Temps d'incubation	Température	Remarques
Déplastification	Xylène	1h	T° ambiante	
	MEA ⁷	1h	T° ambiante	
	Acétone	10 min	T° ambiante	
Réhydratation	Alcool 100	1 min	T° ambiante	
	Alcool 95	1 min	T° ambiante	
	Alcool 70	1 min	T° ambiante	
	Eau distillée	...	T° ambiante	
Démasquage	Tampon citrate pH6	30 min	95°C	
		20 min	T° ambiante	
Rinçage	PBS ⁸ 1X	5 min	T° ambiante	
Saturation des peroxydases endogènes	3% H2O2	20 min	T° ambiante	
Rinçage	PBS 1X	3 x 5 min	T° ambiante	
Blocage AC¹⁰ primaire	Sérum de chèvre + BSA ⁹ Anti -CD31	30 min	T° ambiante	Sérum de chèvre 10% + BSA 4% 1/500e + 1% triton + 4% BSA
		la nuit	4°C	
Rinçage	PBS 1X	3 x 5 min	T° ambiante	
AC secondaire Amplification Rinçage	Anti IgG de lapin biotinylé 1 goutte de streptavidine peroxydase	1 h	T° ambiante	1/300e + 1% triton + 4% BSA Dako Kit LSAB + système HRP
		45 min	T° ambiante	
	PBS 1X	3 x 5 min	T° ambiante	
Révélation	DAB ¹¹ + substrat	5 min	T° ambiante	Dako Kit
Rinçage	Eau distillée	1 min	T° ambiante	
Déshydratation	Alcool 70	1 min	T° ambiante	

⁷ MEA : Mono Ethanol Amine

⁸ PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)

⁹ AC : Anti-Corps

¹⁰ BSA : Bovin Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)

¹¹ DAB : Di Amino Benzidine

	Alcool 95	1 min	T° ambiante	
	Alcool 100	1 min	T° ambiante	
	Alcool 100	1 min	T° ambiante	
Eclaircissement	MCH (3 bains)	3 x 1 min	T° ambiante	

Une fois colorées, les coupes sont montées entre lame et lamelle et collées à l'aide d'une colle de montage Eukitt (Labo Nord, Villeneuve d'Asq, France) pour ensuite être observées au microscope photonique.

9.5. Protocole de révélation de l'activité de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP)

Etape	Réactif	Durée d'incubation	Conditions
DEPLASTIFICATION	Acétone	2 x 5 min	T° ambiante
REHYDRATATION	Ethanol 100 % Ethanol 95% Ethanol 80% Ethanol 60% Ethanol 30%	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	T° ambiante
RINCAGE	Eau autoclavée	5 min	T° ambiante
POST FIXATION	PFA ¹² 4%	5 min	T° ambiante
REVELATION TRAP	Solution de coloration	1h30	37°C chambre humide dans l'obscurité
RINCAGE	Eau autoclavée	5 min	T° ambiante
CONTRE COLORATION	Hématoxyline de Mayer Eau courante Carbonate de lithium Eau courante Eau distillée	25-30 sec rinçage 30 sec rinçage rinçage	T° ambiante

Une fois colorées, les coupes sont montées entre lame et lamelle à l'aide d'une solution aqueuse Mowiol pour ensuite être observées au microscope photonique.

¹² PFA : Para FormAldéhyde

HAYS (Alexandra). – Participation à la mise en évidence des effets de l'irradiation sur la microvascularisation osseuse.

- 104f ; 81 ill. ; 114 ref. ; 30 cm. (Thèse : Chir. Dent. ; Nantes ; 2014)

RESUME : Les cancers des voies aéro-digestives supérieures sont parmi les cancers les plus fréquents. L'ostéoradionécrose (ORN) mandibulaire est la complication la plus sévère survenant après la radiothérapie. Bien qu'étant étudiée depuis de nombreuses décennies, la place de l'atteinte vasculaire dans sa physiopathologie n'est pas encore bien élucidée. Une analyse de la littérature a été réalisée afin de faire le point sur les liens étroits entre l'os et sa vascularisation, ainsi que sur les techniques permettant d'explorer cette dernière. Les récentes avancées technologiques permettent désormais d'investiguer les effets quantitatifs de l'irradiation sur la microvascularisation osseuse. Par la suite, un modèle murin d'ORN a donc été mis au point et étudié grâce à la microtomographie par rayons X, au microscope électronique à balayage, à l'immunohistochimie et aux colorations histologiques afin d'analyser et de quantifier l'atteinte vasculaire radio-induite.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT : Pathologie Buccale et Péri-Buccale

MOTS CLEFS MESH

Ostéoradionécrose – Ostéoradionecrosis

Vascularisation – Blood supply

Mandibule – Mandible

Microtomographie par Rayons X – X-Ray Microtomography

JURY

Président : Professeur Giumelli B.

Directeur : Professeur Weiss P.

Co-directeur : Docteur Bléry P.

Assesseur : Docteur Le Guehenec L.

ADRESSE DE L'AUTEUR

141 route de Gachet – 44300 Nantes

alexandrahays@hotmail.com