

**UNIVERSITE DE NANTES**  
**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE**

**Phosphates de Calcium et cellules autologues :**  
**base d'une ingénierie tissulaire pour la**  
**reconstruction osseuse en territoire irradié.**

**THESE DE DOCTORAT**

Formation ou école doctorale : Chimie Biologie

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : odontologie, biomatériaux

Présentée et soutenue publiquement par

**Emmanuelle LEROUXEL**

Le 15 juin 2007 devant le Jury ci-dessous

**Rapporteurs :** M. Daniel CHAPPARD, Professeur, Angers  
M. Daniel PERRIN, Praticien Hospitalier, Dijon

**Examineurs :** M. Jean-Michel BOULER, Professeur, Nantes  
M. Didier MAURICE, Maître de Conférences, Paris

**Membres invités :** M. Pierre WEISS, Maître de Conférences, Nantes  
M. Jérôme GUICHEUX, Chargé de Recherche, Nantes

**Directeur de thèse :** M. Bernard GIUMELLI, Professeur, Nantes

**Co-directeur :** M. Olivier MALARD, Praticien Hospitalier Universitaire, Nantes

# SOMMAIRE

## **I. PREMIERE PARTIE. GENERALITES INTRODUCTIVES. CANCERS DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES, RADIATIONS IONISANTES ET INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

### 1. ETAT DE L'ART

### 2. LES CANCERS DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES ET LEURS TRAITEMENTS

#### *2.1. Les cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures*

##### 2.1.1. Epidémiologie

###### 2.1.1.1. Classification épidémiologique

###### 2.1.1.2. Classification TNM

##### 2.1.2. Principes thérapeutiques

###### 2.1.2.1. Généralités

###### 2.1.2.2. Modalités thérapeutiques

#### *2.2. La radiothérapie*

##### 2.2.1. Principes d'action de la radiothérapie

###### 2.2.1.1. Généralités

###### 2.2.1.2. La nature des rayonnements ionisants

###### 2.2.1.3. Effets physicochimiques des radiations ionisantes et radiobiologie

###### 2.2.1.4. Dose et fractionnement des radiations ionisantes

##### 2.2.2. Les différentes techniques de radiothérapie

##### 2.2.3. Les indications de la radiothérapie et les associations thérapeutiques

### 3. LES EFFETS DE LA RADIOTHERAPIE SUR LES TISSUS SAINS CERVICO-FACIAUX

#### *3.1. Incidents et accidents pendant la radiothérapie*

#### *3.2. Complications et séquelles de la radiothérapie*

##### 3.2.1. Effets des rayons sur les tissus sains de la région cervico-faciale

##### 3.2.2. Séquelles osseuses et ostéoradionécrose

###### 3.2.2.1. Effets de la radiothérapie sur l'os

###### 3.2.2.2. Ostéoradionécrose

- 3.3. *Impact de la radiothérapie sur les thérapeutiques odontologiques et oto-rhino-laryngologiques*
  - 3.3.1. Avulsions dentaires en terrain irradié
  - 3.3.2. Implantologie en terrain irradié
  - 3.3.3. Exérèse et reconstruction chirurgicales en terrain irradié
- 4. LES TECHNIQUES DE RECONSTRUCTION ET SUBSTITUTS OSSEUX
  - 4.1. *Généralités*
  - 4.2. *Les greffes osseuses*
  - 4.3. *Les substituts osseux*
    - 4.3.1. Propriétés des substituts osseux
      - 4.3.1.1. Définitions
      - 4.3.1.2. Propriétés structurales et mécaniques
      - 4.3.1.3. Propriétés biologiques
    - 4.3.2. Les substituts osseux d'origine biologique
    - 4.3.3. Les substituts osseux d'origine synthétique
      - 4.3.3.1. Généralités
      - 4.3.3.2. Les biocéramiques phosphocalciques
        - 4.3.3.2.1. Généralités
        - 4.3.3.2.2. Le phosphate de calcium biphasé BCP
      - 4.3.3.3. Les substituts osseux injectables
        - 4.3.3.3.1. Généralités
        - 4.3.3.3.2. Le substitut osseux injectable IBS
  - 4.4. *Substituts osseux et irradiation*
    - 4.4.1. Influence du substitut osseux sur la délivrance du rayonnement
    - 4.4.2. Ostéointégration en milieu irradié
- 5. INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE
  - 5.1. *Définition*
  - 5.2. *Les différentes associations*
  - 5.3. *Les cellules souches*
    - 5.3.1. Que sont ces cellules souches ?
    - 5.3.2. Les types de cellules souches
    - 5.3.3. Origine des cellules souches
    - 5.3.4. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs)
      - 5.3.4.1. Isolement des CSMs

5.3.4.2. Caractérisation et marqueurs de surface des CSMs

5.3.4.3. Différenciation et fonctionnalité des CSMs

5.4. *Les différentes études sur les associations*

5.4.1. Les associations possibles

5.4.2. Les associations pour une néoformation osseuse sans irradiation

5.4.2.1. Etudes *in vitro*

5.4.2.2. Etudes *in vivo*

5.4.3. Les associations pour une néoformation osseuse avec irradiation

6. PROBLEMATIQUE ET PLAN DE THESE

**II. DEUXIEME PARTIE. SEQUELLES ANATOMO-PATHOLOGIQUES ET RADIOLOGIQUES DE L'OS IRRADIE A DOSE SUPRA-THERAPEUTIQUE**

1. CONTEXTE D'ETUDE

2. MATERIEL ET METHODES

*2.1. Etude de faisabilité*

2.1.1. Animaux

2.1.2. Expérimentation

2.1.2.1. Radiographies

2.1.2.1.1. Généralités

2.1.2.1.2. Réalisation pratique

2.1.2.2. Procédure d'irradiation

2.1.2.2.1. Généralités

2.1.2.2.2. Calcul de dose

2.1.2.2.3. Réalisation pratique

2.1.2.3. Création des défauts osseux

2.1.2.4. Stabulation

2.1.2.5. Euthanasie et prélèvement des échantillons

*2.2. Etude principale*

2.2.1. Animaux

2.2.2. Expérimentation

2.2.2.1. Séparation des animaux

2.2.2.2. Radiographies

2.2.2.3. Procédure d'irradiation

2.2.2.4. Création des défauts osseux

- 2.2.2.5. Stabulation
- 2.2.2.6. Euthanasie et prélèvement des échantillons
- 2.2.2.7. Synthèse
- 2.2.3. Etude des explants
  - 2.2.3.1. Observations radiologiques
  - 2.2.3.2. Observations histologiques
    - 2.2.3.2.1. Inclusion à la paraffine
    - 2.2.3.2.2. Réalisation des coupes
    - 2.2.3.2.3. Coloration et étude histologique

### 3. RESULTATS

#### 3.1. *Etude de faisabilité*

- 3.1.1. Procédure d'anesthésie
- 3.1.2. Radiographies
- 3.1.3. Procédure d'irradiation
- 3.1.4. Création des défauts osseux

#### 3.2. *Etude principale*

- 3.2.1. Procédure d'anesthésie
- 3.2.2. Radiographies
- 3.2.3. Procédure d'irradiation
- 3.2.4. Création des défauts osseux

#### 3.3. *Synthèse*

#### 3.4. *Observations radiologiques*

- 3.4.1. Résultats
- 3.4.2. En fonction de la dose d'irradiation
- 3.4.3. En fonction du défaut osseux

#### 3.5. *Observations histologiques*

- 3.5.1. Résultats
- 3.5.2. En fonction de la dose d'irradiation
- 3.5.3. En fonction du défaut osseux

### 4. DISCUSSION

### 5. CONCLUSION

### **III. TROISIEME PARTIE. ETUDE DE L'ASSOCIATION IBS - MOELLE OSSEUSE IMPLANTEE EN SITE OSSEUX APRES IRRADIATION**

#### 1. CONTEXTE D'ETUDE

#### 2. MATERIEL ET METHODES

##### *2.1. Préparation du matériau*

###### 2.1.1. Préparation de l'IBS (Injectable Bone Substitute)

###### 2.1.1.1. Généralités

###### 2.1.1.2. Composition

###### 2.1.2. Stérilisation de l'IBS

##### *2.2. Animaux*

##### *2.3. Expérimentation*

###### 2.3.1. Séparation des animaux

###### 2.3.2. Procédure d'irradiation

###### 2.3.2.1. Généralités

###### 2.3.2.2. Réalisation pratique

###### 2.3.3. Procédure chirurgicale et implantation

###### 2.3.3.1. Généralités et répartition des implants

###### 2.3.3.2. Prélèvement de la moelle osseuse

###### 2.3.3.3. Création des défauts osseux et implantation

###### 2.3.3.4. Stabulation

###### 2.3.4. Euthanasie et prélèvement des échantillons

###### 2.3.5. Synthèse de l'expérimentation

##### *2.4. Etude des explants*

###### 2.4.1. Préparation des échantillons

###### 2.4.1.1. Inclusion dans une résine de Méthyl-Méthacrylate

###### 2.4.1.2. Coupe des échantillons

###### 2.4.2. Colorations et étude histologique

###### 2.4.3. MEB et analyse d'image

###### 2.4.3.1. Le polissage des échantillons

###### 2.4.3.2. La métallisation des échantillons

###### 2.4.3.3. Acquisition des images

###### 2.4.3.4. Analyse d'image

###### 2.4.3.5. Paramètres mesurés

###### 2.4.3.6. Analyse statistique

### 3. RESULTATS

#### *3.1. Techniques d'irradiation et d'implantation*

#### *3.2. Recueil et analyse de la moelle osseuse*

#### *3.3. Etude histologique*

#### *3.4. L'observation en Microscopie Electronique à Balayage*

##### 3.4.1. Etude de la repousse osseuse

###### 3.4.1.1. Etude qualitative

###### 3.4.1.2. Etude quantitative

##### 3.4.2. Etude de la dégradation du matériau

###### 3.4.2.1. Généralités

###### 3.4.2.2. En fonction de l'irradiation

###### 3.4.2.3. En fonction de la greffe de moelle osseuse

### 4. DISCUSSION

### 5. CONCLUSION

## **IV. QUATRIEME PARTIE. ETUDE DE L'ASSOCIATION BCP - MOELLE OSSEUSE TOTALE VERSUS BCP – MO CSMS ET BCP – AT CSMS IMPLANTEES EN SITE OSSEUX APRES IRRADIATION**

### 1. CONTEXTE D'ETUDE

### 2. MATERIEL ET METHODES

#### *2.1. Etude in vitro*

##### 2.1.1. Animaux

##### 2.1.2. Etude de la moelle osseuse

##### 2.1.3. Etude du tissu adipeux

#### *2.2. Etude in vivo*

##### 2.2.1. Préparation et caractérisation du matériau

###### 2.2.1.1. Synthèse du BCP

###### 2.2.1.2. Composition

###### 2.2.1.3. Stérilisation du BCP

##### 2.2.2. Animaux

##### 2.2.3. Expérimentation

###### 2.2.3.1. Séparation des animaux

###### 2.2.3.2. Procédure d'irradiation

- 2.2.3.2.1. Généralités
- 2.2.3.2.2. Réalisation pratique
- 2.2.3.3. Procédure chirurgicale et implantation
  - 2.2.3.3.1. Généralités et répartition des implants
  - 2.2.3.3.2. Création des défauts osseux et implantation
  - 2.2.3.3.3. Stabulation
- 2.2.3.4. Euthanasie et prélèvement des échantillons
- 2.2.3.5. Synthèse de l'expérimentation
- 2.2.4. Etude des explants
  - 2.2.4.1. Préparation des échantillons
    - 2.2.4.1.1. Inclusion dans une résine de Glycol-Méthacrylate (GMA)
    - 2.2.4.1.2. Coupe des échantillons
  - 2.2.4.2. Colorations et étude histologique
  - 2.2.4.3. MEB, analyse d'image et analyse statistique
- 3. RESULTATS
  - 3.1. *Etude in vitro*
    - 3.1.1. Etude de la moelle osseuse
    - 3.1.2. Etude du tissu adipeux
  - 3.2. *Etude in vivo*
    - 3.2.1. Préparation et caractérisation du matériau
    - 3.2.2. Expérimentation
      - 3.2.2.1. Procédure d'anesthésie
      - 3.2.2.2. Procédure d'irradiation
      - 3.2.2.3. Procédure chirurgicale et implantation
        - 3.2.2.3.1. Création des défauts osseux et implantation
        - 3.2.2.3.2. Stabulation
    - 3.2.3. Etude des explants
      - 3.2.3.1. Colorations et étude histologique
      - 3.2.3.2. MEB, analyse d'image et analyse statistique
        - 3.2.3.2.1. Etude de la repousse osseuse
        - 3.2.3.2.2. Etude de la dégradation du matériau
- 4. DISCUSSION
- 5. CONCLUSION

## V. CONCLUSIONS GENERALES DE L'ETUDE – PERSPECTIVES



## **VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **VII. ANNEXES**

ANNEXE 1 : procédure de coloration à l' Hématoxyline Phloxine Safran (HPS)

ANNEXE 2 : procédure d'inclusion dans le Méthyl-Méthacrylate (MMA) à – 20°C

ANNEXE 3 : procédure de coloration par le Solochrome-Cyanine R sur résine MMA

ANNEXE 4 : procédure de préparation du milieu de transport et du milieu de culture complet

ANNEXE 5 : procédure de préparation du milieu de culture ostéogénique

ANNEXE 6 : procédure de coloration au rouge alizarine

ANNEXE 7 : procédure d'isolation de cellules stromales à partir de tissu adipeux de rat

ANNEXE 8 : procédure d'inclusion dans le Glycol-Méthacrylate (GMA)

ANNEXE 9 : procédure de coloration par le Trichrome de Goldner sur résine GMA

ANNEXE 10 : procédure de coloration par le Pentachrome de Movat sur résine GMA

## **VIII. COMMUNICATIONS ISSUES DE CES TRAVAUX**

## LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

ANOVA	Analyse Of Variance (analyse de variance)
AT CSMs	Cellules Souches Mésenchymateuses issues du Tissu Adipeux
$\alpha$ MEM	Alpha Modified Eagle's Medium
BCP	Biphasic Calcium Phosphate (Phosphate de Calcium Biphase)
$\beta$ TCP	Phosphate $\beta$ Tricalcique
CRLCC	Centre Régional de Lutte Contre le Cancer
CSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSMs	Cellules Souches Mésenchymateuses
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
GMA	Glycol-Méthacrylate
GVHR	Graft Versus Host Reaction (réaction du greffon contre l'hôte)
GVHD	Graft Versus Host Disease (maladie du greffon contre l'hôte)
Gy	Gray (unité de mesure de l'énergie ionisante reçue par un corps biologique)
HA	Hydroxyapatite
HPMC	Hydroxy-Propyl-Methyl-Cellulose
HPS	Hématoxyline Phloxine Safran
IBS	Injectable Bone Substitute (Substitut Osseux Injectable)
IFR	Institut Fédératif de la Recherche
IMRT	Radiothérapie en Modulation d'Intensité
kV	kilo Volt
L-glut	L-Glutamine
mA	milli Amprère
MAPCS	Multipotent Adult progenitor cells
MBCP	Macroporous Biphasic Calcium Phosphate (phosphate calcium biphase macroporeux)
MEB	Microscop(i)e Electronique à Balayage
MeV	Mega-electron Volt
MMA	Méthyl-Méthacrylate
MO	Moelle Osseuse
MO CSMs	Cellules Souches Mésenchymateuses issues de la Moelle Osseuse

MOT	Moelle Osseuse Totale
ns	Non Significatif
ORN	Ostéoradionécrose
PBS	Phosphate Buffer Serum (tampon phosphate)
PMMA	Méthyl-Méthacrylate purifié
P/S	Pénicilline G / Streptomycine
RTE	Radiothérapie Externe
s	Significatif
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TGFβ	Transforming Growth Factor β (facteur de croissance transformant bêta)
TNM	Classification des tumeurs Malignes « Tumor Node Metastase »
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UTE	Unité de Thérapie Expérimentale
VADS	Voies Aéro-Digestives Supérieures
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (facteur de croissance endothélial )

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°I :	classification TNM des cancers d'après l'Union Internationale Contre le Cancer
Tableau N°II :	d'après RTOG / EORTC - cotation de la morbidité tardive induite par la radiothérapie
Tableau N°III :	application thérapeutique de l'utilisation de moelle osseuse et de CSMs pour la reconstruction osseuse dans divers modèles animaux
Tableau N°IV :	répartition des défauts osseux et doses d'irradiation
Tableau N°V :	répartition finale des défauts osseux et doses d'irradiation
Tableau N°VI :	observations radiologiques après une irradiation de 30 Gy
Tableau N°VII :	observations radiologiques après une irradiation de 45 Gy
Tableau N°VIII :	observations radiologiques en fonction de la dose d'irradiation
Tableau N°IX :	observations radiologiques en fonction du défaut osseux
Tableau N°X :	observations histologiques après une irradiation de 30 Gy
Tableau N°XI :	observations histologiques après une irradiation de 45 Gy
Tableau N°XII :	observations histologiques en fonction de la dose d'irradiation
Tableau N°XIII :	observations histologiques en fonction de la réalisation d'un défaut osseux
Tableau N°XIV :	répartition des animaux et des sites d'implantation
Tableau N°XV :	analyse cytologique du myélogramme de la moelle osseuse recueillie et implantée
Tableau N°XVI :	résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction de l'irradiation

- Tableau N°XVII : résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction du type de comblement effectué
- Tableau N°XVIII : résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction de l'apport de moelle osseuse
- Tableau N°XIX : dégradation de la céramique de BCP en fonction de l'existence d'une irradiation
- Tableau N°XX : dégradation de la céramique de BCP en fonction de l'association d'une greffe de moelle osseuse
- Tableau N°XXI : répartition des animaux et des sites d'implantation
- Tableau N°XXII : analyse cytologique du myélogramme de la moelle osseuse totale recueillie et implantée
- Tableau N°XXIII : résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction du type de comblement effectué
- Tableau N°XXIV : résultats des tests statistiques de la dégradation de la céramique de BCP en fonction du type de comblement effectué

## LISTE DES FIGURES

- Figure N°1 : cinétique des dommages radio-induits (d'après Tubiana M. en 1986 et Schmidt-Ullrich en 2000)
- Figures N°2 : radiographie rétro-alvéolaire des rates, générateur long-cône, angulateur et système de RINN®
- Figures N°3 : création des défauts osseux
- Figures N°4 : irradiation des rates
- Figure N°5 : résumé du déroulement chronologique de l'expérimentation
- Figures N°6 : radiographies rétro-alvéolaires
- Figures N°7 : aspects macroscopiques
- Figures N°8 : aspects microscopiques
- Figures N°9 : création des défauts osseux et implantation
- Figure N°10 : résumé du déroulement chronologique de l'expérimentation
- Figures N°11 : colorations Solochrome-Cyanine R
- Figures N°12 : défauts osseux en MEB
- Figure N°13 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux irradiés et non irradiés en fonction des comblements effectués
- Figure N°14 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux non irradiés
- Figure N°15 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux irradiés
- Figure N°16 : dégradation de la céramique dans les défauts osseux irradiés et non irradiés en fonction de l'existence d'une irradiation préalable.

- Figure N°17 : dégradation de la céramique en fonction de l'association d'une greffe de moelle osseuse à l'IBS
- Figures N°18 : irradiation des rats
- Figures N°19 : création des défauts osseux et implantation
- Figure N°20 : résumé du déroulement chronologique de l'expérimentation
- Figure N°21 : coloration rouge alizarine des cellules issues de la moelle osseuse à J30
- Figure N°22 : coloration rouge alizarine des cellules issues des différents tissus adipeux
- Figures N°23 : défauts osseux irradiés colorés au Pentachrome de Movat
- Figures N°24 : défauts osseux irradiés colorés au Pentachrome de Movat
- Figures N°25 : défauts osseux irradiés colorés au Pentachrome de Movat
- Figures N°26 : défauts osseux en MEB
- Figure N°27 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux irradiés
- Figure N°28 : dégradation de la céramique de BCP en fonction de l'association d'une greffe de MOT, de MO CSMs ou d'AT CSMs

**I. PREMIERE PARTIE :**  
**GENERALITES INTRODUCTIVES.**  
**CANCERS DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES,**  
**RADIATIONS IONISANTES ET INGENIERIE TISSULAIRE**  
**OSSEUSE.**



# 1. ETAT DE L'ART

---

Les cancers cervico-faciaux représentent 12% des cancers en France. Les indications thérapeutiques sont codifiées et consensuelles et dépendent de la classification TNM établie [1]. Le traitement des cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx et du massif facial repose le plus souvent sur une association radio-chirurgicale. Une chimiothérapie peut également compléter le traitement. La chirurgie carcinologique est une chirurgie d'exérèse large devant passer à distance des limites de la lésion tumorale [2]. Elle est mutilante en particulier si l'exérèse menée à distance de la tumeur impose l'ablation de l'os environnant (mandibulaire et/ou maxillaire). La radiothérapie externe post-opératoire complète ce traitement chirurgical dans plus de 50% des cas [3]. Ces traitements carcinologiques induisent des effets secondaires et séquelles notables au niveau de la sphère oro-faciale, altérant considérablement la qualité de vie des patients. Le développement d'une ostéoradionécrose (ORN), véritable lyse osseuse, constitue une complication majeure et des plus redoutées lors d'une irradiation cervico-faciale [4,5].

Le chirurgien peut être amené à intervenir en territoire irradié, soit pour l'exérèse d'une nouvelle tumeur ou d'une récurrence tumorale, soit pour le traitement chirurgical d'une ORN [6]. La nécessité de telles interventions en territoire préalablement irradié pose le problème de la reconstruction chirurgicale. Les greffes osseuses micro-anastomosées ne sont pas toujours envisageables en raison de l'altération post-radique de la qualité vasculaire du lit receveur et de l'état général du patient [7]; elles peuvent s'accompagner de thrombose, retard de cicatrisation et absence d'ostéointégration [7-9]. Par ailleurs, le chirurgien peut également être amené à intervenir en territoire irradié pour des extractions dentaires [10-12] et/ou reconstruction par implantologie oro-faciale [13]. Ces thérapeutiques peuvent également se compliquer de retard de cicatrisation, d'absence d'ostéointégration et du déclenchement d'une ORN.

En l'absence d'irradiation, l'utilisation de biomatériaux de substitution osseuse est largement documentée. Les phosphates de calcium biphasés (BCP) sont des substituts osseux synthétiques utilisés dans des applications cliniques diverses, orthopédiques, maxillo-faciales et odontologiques. Ces matériaux sont biocompatibles, bioactifs et biodégradables présentant d'excellentes propriétés ostéoconductrices [14,15]. Au niveau maxillo-facial, ils sont utilisés

dans le comblement de perte de substance, après extraction dentaire et surtout dans le cadre de l'implantologie, pour augmenter la quantité d'os disponible, et au niveau des implants eux-mêmes pour améliorer leur ostéointégration.

En territoire irradié, les publications sont beaucoup moins fréquentes sur l'utilisation de ces substituts osseux. Un biomatériau implanté (Hydroxyapatite) avant une irradiation thérapeutique n'interfèrerait pas avec le traitement carcinologique [16,17]. Par ailleurs, certains auteurs ont émis des réserves quant à la qualité de l'ostéointégration de biomatériaux implantés en territoire préalablement irradié [17].

Ces dernières années, les thérapeutiques de l'ingénierie tissulaire osseuse se sont largement développées, permettant la formation de matériaux hybrides associant des céramiques phosphocalciques à des cellules souches ou à de la moelle osseuse totale, afin d'obtenir un effet ostéoinducteur chez ces matériaux construits [18].

Une telle association en territoire irradié n'a fait l'objet que de deux publications à ce jour, issues de notre laboratoire [19,20].

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord développé un modèle animal d'ostéoradionécrose. Puis nous avons testé l'association d'un biomatériau injectable à une allogreffe de moelle osseuse totale dans un modèle animal irradié à des doses d'irradiation thérapeutique. Enfin, nous avons évalué la reconstruction osseuse dans le même modèle animal irradié à des doses d'irradiation thérapeutique l'association d'une greffe de moelle osseuse totale ou bien l'adjonction de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse ou du tissu adipeux dans la reconstruction osseuse.

## 2. LES CANCERS DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES ET LEURS TRAITEMENTS

---

### 2.1. Les cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures

#### 2.1.1. Epidémiologie

##### 2.1.1.1. Classification épidémiologique

Sous le terme de cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures (VADS) sont regroupés les cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx, du larynx, de l'œsophage supérieur, du nasopharynx, des glandes salivaires, du massif facial et des fosses nasales.

Ces cancers représentent 12% des cancers en France. La prévalence est plus faible chez la femme (estimée à 2,5%), mais en constante augmentation. Ils représentent 12% des causes de décès par cancer chez l'homme et 1,5% chez la femme. Un pic de fréquence de survenue d'un cancer des VADS est observé entre 45 et 65 ans, deux tiers des cas apparaissant avant 65 ans [21,22]. Une des caractéristiques des carcinomes des VADS est la survenue de cancers multiples (9,4% sur une série de l'Institut Gustave-Roussy dont 42,1% cancers simultanés, ou synchrones, et 57,9% cancers successifs, ou métachrones [23]).

Les cancers de la **cavité buccale** et de l'**oropharynx** présentent une incidence très variable dans le monde [21,22]. En France, les tumeurs de la cavité buccale représentent plus d'un tiers des cancers des VADS. La première localisation est la langue avec 41,8% des cas, puis le plancher buccal (25,8%). Les tumeurs de l'oropharynx sont également très fréquentes. Les cancers de la loge amygdalienne représentent 13% des cancers des VADS en France, soit 1 à 1,5% de l'ensemble des cancers. Les cancers du voile du palais sont quant à eux assez rares, mais présentent un risque très important d'association à un deuxième cancer (50% des cas). On observe une nette prédominance masculine qui tend à se réduire. En France, en Europe et aux USA, la relation épidémiologique de ces tumeurs à une intoxication éthylo-tabagique est incontestable [3,24]. Néanmoins, les tumeurs de la cavité buccale peuvent également se développer à partir de lésions précancéreuses (leucoplasies (pouvant être également d'origine tabagique) et érythroplasies) [21].

Les cancers du **massif facial (fosses nasales et sinus)** présentent une faible incidence [25], comparée à celle des autres localisations des VADS (0,2% de l'ensemble des cancers et entre 1,5 à 2% des tumeurs des VADS). En France, l'incidence annuelle de ces tumeurs est comprise entre 0,1 et 0,7 pour 100 000 hommes et entre 0,1 et 0,2 pour 100 000 femmes. Il existe une prédominance masculine, l'incidence augmente avec l'âge et devient plus fréquente entre 60 et 70 ans. L'association de ces tumeurs naso-sinusiennes à des expositions professionnelles est incontestable (expositions au bois, au nickel, au chrome et aux radio-isotopes). Les cancers liés aux expositions au bois et au nickel sont reconnus comme cancers professionnels et inscrits au tableau sous les numéros respectifs 47 et 47<sup>ter</sup>. L'éthylotabagisme n'est pas une étiologie reconnue et n'est que rarement retrouvé dans ces tumeurs [22].

#### **2.1.1.2. Classification TNM**

La classification TNM est une classification internationale établie d'après l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) [1]. Cette classification présente une valeur thérapeutique et pronostique. Elle permet de préciser l'indication thérapeutique et l'extension tumorale. Elle permet également la comparaison de résultats thérapeutiques. Elle est représentée dans le Tableau N°I.

Stade	T (site tumoral primitif)	N (aires ganglionnaires)	M (métastases)
<b>0</b>	Pas de tumeur primitive	Pas d'adénopathie	Pas de métastase
<b>i s</b>	Carcinome <i>in situ</i>	-	-
<b>1</b>	Tumeur ≤ 2 cm	Adénopathie homolatérale unique ≤ 3 cm	Métastase à distance unique
<b>2</b>	2 cm < Tumeur ≤ 4 cm	N2a 3 cm < Adénopathie ≤ 6 cm Homolatérale unique	Métastases à distance multiples
		N2b Adénopathies ≤ 6 cm Homolatérales multiples	
		N2c Adénopathies ≤ 6 cm Bilatérales ou controlatérales	
<b>3</b>	Tumeur > 4 cm	Adénopathie > 6 cm	
<b>4</b>	Extension tumorale aux muscles, à l'os, aux cartilages, à la peau	-	
<b>X</b>	Non classable	Non classable	Non classable

**Tableau N°I : classification TNM des cancers d'après l'Union Internationale Contre le Cancer [1]**

## 2.1.2. Principes thérapeutiques

### 2.1.2.1. Généralités

Le traitement des tumeurs malignes des VADS repose sur trois thérapeutiques, utilisées seules ou en association, dans un but curatif ou palliatif : la chirurgie carcinologique, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les indications thérapeutiques sont codifiées et consensuelles. Le traitement est décidé lors de Réunions de Concertations Pluridisciplinaires après examens cliniques et complémentaires, tenant compte de la classification TNM de la tumeur, de l'état général, de l'âge et des antécédents du patient ainsi que d'un éventuel avis anesthésique.

### 2.1.2.2. Modalités thérapeutiques

- La **chirurgie carcinologique** permet l'exérèse de la tumeur à distance de ses limites associée ou non à un curage ganglionnaire radical ou fonctionnel, uni ou bilatéral. La chirurgie peut être décidée d'emblée ; elle peut faire suite à une chimiothérapie néoadjuvante ou à une radiothérapie. Différentes techniques chirurgicales sont mises en œuvre en fonction de la localisation tumorale. La chirurgie demeure le premier temps thérapeutique de la majorité des situations rencontrées au niveau de la cavité buccale [26], de l'oropharynx et du massif facial [3,27-29]. La chirurgie carcinologique est une chirurgie d'exérèse large devant passer à distance des limites de la lésion tumorale [2]. Dans certains cas, la chirurgie d'exérèse est associée à une reconstruction chirurgicale par la réalisation de lambeaux locaux ou régionaux, pédiculés ou libres.
- La **radiothérapie** est basée sur l'utilisation de radiations ionisantes, de nature et d'énergies variées, capable de créer des ions dans la matière qu'elles traversent. La radiothérapie peut être utilisée en traitement exclusif, en concomitant à la chimiothérapie ou en adjuvant à la chirurgie [30,31]. La radiothérapie externe post-opératoire complète le traitement chirurgical dans plus de 50% des cas [3].
- La **chimiothérapie** peut être utilisée en induction afin d'éviter une chirurgie mutilante en cas de réponse favorable (thérapeutique de préservation d'organe dans les cancers du larynx), de façon concomitante à la radiothérapie en adjuvant ou en traitement palliatif [32].

## 2.2. La radiothérapie

### 2.2.1. Principes d'action de la radiothérapie

#### 2.2.1.1. Généralités

La radiothérapie correspond à l'utilisation thérapeutique des radiations ionisantes. Le gray (Gy) représente aujourd'hui l'unité de dose des radiations ionisantes absorbées, qui est équivalente à l'énergie absorbée par une quantité de matière donnée ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ ) [30].

L'action des radiations ionisantes au niveau des tissus est physique, puis chimique et enfin biologique. Les particules incidentes provoquent l'ionisation (= éjection d'un électron par effet Compton ou photoélectrique) ou l'excitation (= passage d'un électron sur une orbite d'énergie supérieure) des atomes cellulaires.

### 2.2.1.2. La nature des rayonnements ionisants

Nous distinguons les rayonnements particuliers des rayonnements électromagnétiques.

- Les **rayonnements particuliers** sont constitués de particules chargées ou de particules neutres. Les particules chargées (électrons, protons, ions lourds, ...) peuvent mettre en mouvement, grâce à leur charge électrique, des électrons du milieu irradié. Les particules neutres provoquent quant à elles des ionisations en entrant en collision avec les électrons.
- Les **rayonnements électromagnétiques** sont représentés par les rayons X et rayons gamma. Ils se comportent comme un rayonnement corpusculaire et sont assimilés à un faisceau de photons. Ils peuvent naître au niveau des couches périphériques de l'atome (rayons X) ou à l'intérieur du noyau (rayons gamma).

### 2.2.1.3. Effets physicochimiques des radiations ionisantes et radiobiologie

La cinétique de ces effets est représentée dans la Figure N°1.

- Les **effets moléculaires** de la radiothérapie

Les rayonnements non chargés (photons et neutrons) sont indirectement ionisants et les particules chargées (électrons et protons) sont directement ionisantes. Les électrons ionisés ou excités sont à l'origine des effets biologiques observés. La molécule cible de ces radiations ionisantes est l'ADN. Il est directement lésé par la particule incidente ou indirectement lésé par l'intermédiaire des radicaux libres (fragments de particules non chargées qui résultent de

la rupture d'une liaison covalente, principalement issus de la radiolyse de l'eau cellulaire). Ces étapes ne durent que quelques fractions de secondes. Les effets moléculaires induisent ensuite des effets cellulaires [33].

- Les **effets cellulaires** de la radiothérapie

Les effets cellulaires s'étendent sur une période de quelques minutes à plusieurs mois. Ils sont caractérisés par des changements morphologiques des cellules (noyau cellulaire, cytoplasme, membranes et vacuoles) qui induisent une perte de la fonction cellulaire. Une mort cellulaire immédiate ou retardée est observée. La mort cellulaire immédiate ne s'observe qu'à des doses massives de radiothérapie de plusieurs centaines de grays. Les radiations ionisantes induisent des lésions cellulaires qui ne sont pas létales pour la plupart (= lésions sublétales) et qui peuvent se réparer par l'intermédiaire d'enzymes (ADN polymérase). La réparation peut être *ad integrum*, erronée, ou ne pas se faire. Pour des doses utilisées en radiothérapie, la mort cellulaire est retardée et induite par accumulation des lésions sublétales. Les défauts de réparation conduisent à des délétions et des réarrangements du génome. Une ou plusieurs mutations aboutissent à la perte de fonction d'un ou plusieurs gènes. La mutation d'un des allèles composant le gène peut entraîner le codage d'une protéine inactive, le codage d'une protéine anormale inactive ou le codage d'une nouvelle protéine. Le codage d'une nouvelle protéine, responsable d'une expression phénotypique anormale, présente un potentiel carcinogène [33].

- Les **effets tissulaires** de la radiothérapie

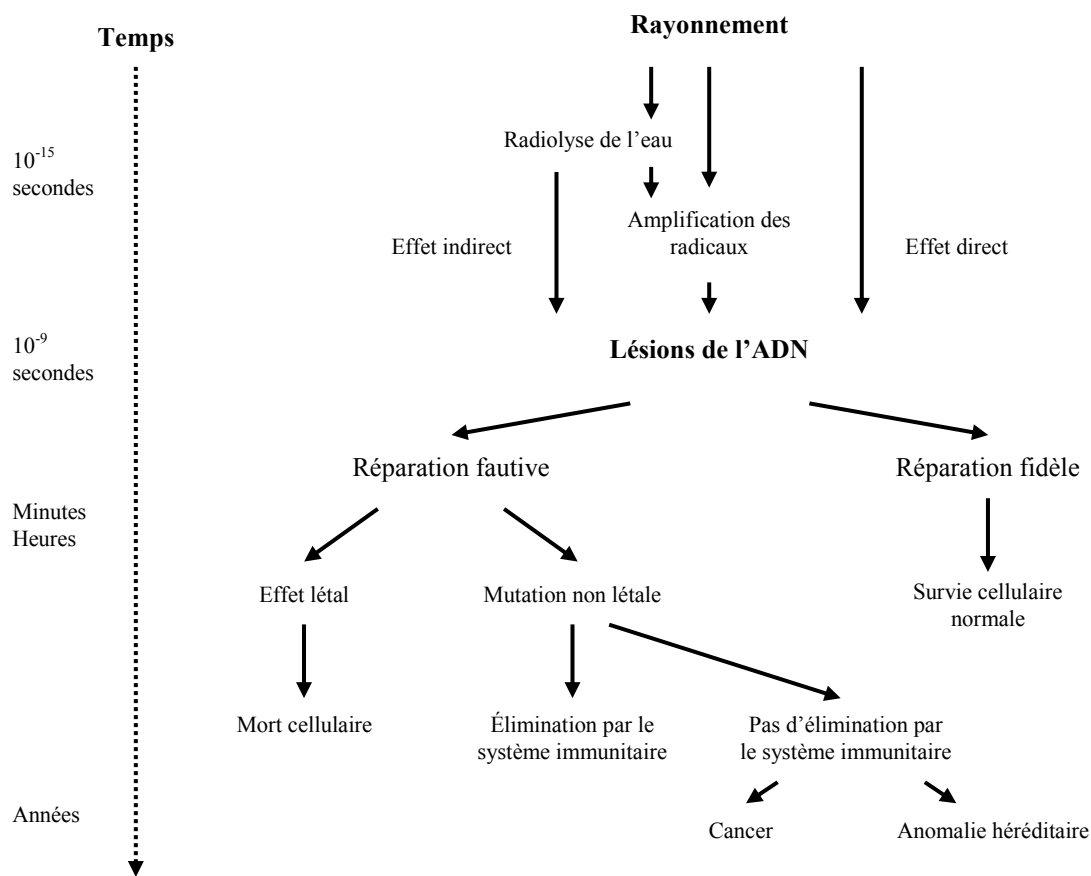
Les effets cellulaires sont ainsi à l'origine des conséquences tissulaires de la radiothérapie. Les effets tissulaires souhaités se produisent ainsi au niveau de la tumeur : la variété histologique et l'index mitotique de la tumeur sont les éléments essentiels de sa radiosensibilité. Cependant, les effets tissulaires se produisent également au niveau des tissus sains [30,31].



#### **2.2.1.4. Dose et fractionnement des radiations ionisantes**

Le fractionnement est le nombre de séances effectuées afin de délivrer la dose de radiations ionisantes souhaitée dans un temps donné. Ainsi, plus le fractionnement est important, plus la dose cumulée est élevée afin d'obtenir l'effet biologique recherché. En thérapeutique humaine, les doses sont fractionnées afin d'obtenir des effets secondaires moindres tout en ayant de meilleurs résultats carcinologiques.

Les radiations ionisantes utilisées habituellement en thérapeutique humaine sont des photons issus du Cobalt 60. La dose totale délivrée est située entre 50 et 70 Gy fonction des résultats anatomopathologiques des pièces d'exérèse et du champ d'irradiation (lit tumoral et chaînes ganglionnaires). Le fractionnement habituellement utilisé est de 2 Gy délivrés chaque jour, 5 jours par semaine, pendant 5 à 7 semaines. Certains protocoles thérapeutiques ont également testé un hyper fractionnement de la dose d'irradiation délivrée [34,35].



**Figure N°1 : cinétique des dommages radio-induits (d'après Tubiana M. en 1986 [36] et Schmidt-Ullrich en 2000 [37])**

### 2.2.2. Les différentes techniques de radiothérapie

Trois techniques de radiothérapie sont actuellement pratiquées : la téléradiothérapie (radiothérapie transcutanée ou radiothérapie externe), la curiethérapie (radiothérapie interstitielle) et la radiothérapie métabolique [30,31,38].

- La **radiothérapie externe conventionnelle** utilise des faisceaux de radiations pénétrant les tissus à travers la peau.

- La **curiethérapie** consiste à implanter des sources radioactives scellées dans la tumeur (*endocuriethérapie* ou *curiethérapie interstitielle*), au contact de la tumeur dans une cavité naturelle (*plésiocuriethérapie* ou *curiethérapie endocavitaire*) ou au contact de la tumeur dans un conduit naturel (*curiethérapie endoluminale*) [38].
- La **radiothérapie métabolique** utilise des radioéléments administrés sous forme injectable (ex : iode 131).

### 2.2.3. Les indications de la radiothérapie et les associations thérapeutiques

Pour les cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx et du massif facial, le traitement initial est la chirurgie si le terrain le permet, si les extensions tumorales permettent une exérèse carcinologique complète et si l'intervention est compatible avec des séquelles fonctionnelles acceptables. La radiothérapie est réalisée secondairement sur le lit tumoral et/ou les aires ganglionnaires [30,31,39].

Ainsi, la radiothérapie :

- peut être proposée en **traitement exclusif**,
- peut être associée à une **chimiothérapie** concomitante,
- peut être utilisée en complément de la **chirurgie** sur le lit tumoral et/ou les chaînes ganglionnaires,
- peut être enfin utilisée en complément de la **chirurgie** et associée à une **chimiothérapie** [25,27,35].

La radiothérapie a pour objectif de délivrer une dose suffisante de radiations ionisantes au volume-cible tumoral tout en épargnant les organes critiques voisins. Cependant, ces radiations ionisantes atteignent également les tissus sains, ce malgré des thérapeutiques de plus en plus ciblées. C'est pour cela que la radiothérapie en modulation d'intensité ou IMRT se développe [40].

### 3. LES EFFETS DE LA RADIOTHERAPIE SUR LES TISSUS SAINS CERVICO-FACIAUX

---

#### 3.1. Incidents et accidents pendant la radiothérapie

- Les **lésions muqueuses**, encore appelées radiomucites, sont précoces, systématiques et très gênantes lors d'une irradiation cervico-faciale ; elles se présentent sous forme d'érythème, puis d'épithélite exsudative. Elles peuvent nécessiter la mise en place d'une sonde naso-gastrique et dans certains cas exceptionnels l'arrêt temporaire de la radiothérapie [30,41,42].
- Les **lésions cutanées**, encore appelées radiodermites, sont plus tardives lors d'une irradiation cervico-faciale ; elles se présentent sous forme d'un érythème, puis d'une exsudation [30,31].

#### 3.2. Complications et séquelles de la radiothérapie

##### 3.2.1. Effets des rayons sur les tissus sains de la région cervico-faciale

L'irradiation de la cavité buccale et de l'oropharynx peut induire une dysphagie, une agueusie ainsi que des altérations dentaires. L'irradiation du rhinopharynx et du massif facial peut induire une rhinopharyngite chronique, une hypoacousie, une atteinte oculaire ainsi que des séquelles endocriniennes. L'irradiation de la région cervicale peut induire une sclérose sous-cutanée, un lymphoedème (jabot sous-mentonnier), des télangiectasies et une sclérose musculaire. Les séquelles post-radiothérapeutiques peuvent être également majorées par l'association d'une chirurgie et/ou d'une chimiothérapie.

Les séquelles et complications de la radiothérapie peuvent toucher l'ensemble des tissus irradiés [30,31,41,42] :

- Les **atteintes cutanées** sont caractérisées par une pigmentation, une épilation et une sclérose cutanée de la zone irradiée. Une nécrose cutanée reste exceptionnelle et peut faire suite à une nécrose extensive des plans profonds.

- Les **atteintes muqueuses** sont caractérisées par une atrophie et une fragilité des muqueuses. Elles peuvent également être le siège de candidoses. Les nécroses muqueuses existent, atteignent essentiellement la cavité buccale (langue et plancher buccal) et l'oropharynx (loge amygdalienne et sillon glosso-amygdalien); elles sont très douloureuses et de cicatrisation longue.
- Les **atteintes musculaires** sont caractérisées par une atrophie, une dégénérescence, une sclérose, une myosite et une fibrose musculaire. Ces séquelles musculaires peuvent induire un trismus évoluant vers une limitation chronique de l'ouverture buccale. Des nécroses musculaires sont également rencontrées.
- Les **atteintes vasculaires** sont caractérisées par une fibrose des vaisseaux. Ces phénomènes induisent une hypovascularisation, un lymphoedème et des télangiectasies. Des thromboses vasculaires sont rarement observées mais peuvent induire une hémiplégie (artérite radique). L'ischémie de la pulpe dentaire induit quant à elle une dégénérescence odontoblastique.
- Les **atteintes salivaires** sont caractérisées par des modifications quantitatives (hypersalivation puis hypo- ou asialie liée à une atrophie des glandes salivaires) et des modifications qualitatives de la salive (modification des composants, de la flore microbienne et du pH salivaire).
- Les **atteintes gustatives** sont caractérisées par une dysgueusie ou une agueusie à partir d'une irradiation de 20 Gy ; ces altérations sont en général transitoires.
- Les **atteintes dentaires** sont caractérisées par une altération de l'émail puis de la dentine pouvant aboutir à la formation de dents d'ébène. Ces séquelles dentaires sont indirectes à l'irradiation, elles proviennent de la xérostomie. Une perturbation du développement dentaire peut être également observée lors d'une irradiation chez l'enfant.
- Les **atteintes neurologiques** sont caractérisées par des radio-myélites. Une atteinte du système nerveux central peut exceptionnellement être observée.
- Les **atteintes cartilagineuses** sont caractérisées par des nécroses, qui restent cependant exceptionnelles.
- Enfin, les **atteintes osseuses** feront l'objet ultérieurement d'un chapitre distinct.

L'apparition d'un **cancer radio-induit** constitue une des complications majeures de la radiothérapie [43]. La fréquence de ces cancers radio-induits reste difficile à apprécier (1/250 patients irradiés pour un cancer des VADS). Cependant deux facteurs doivent être pris en compte :

- Leur sous-estimation, car les 3/4 des malades n'auront pas le temps de développer un cancer radio-induit (pourcentage de malades guéris à 10 ans est de 25%),
- Et le fait qu'il s'agisse de tumeurs mésoenchymateuses.

	<b>Grade 0</b>	<b>Grade 1</b>	<b>Grade 2</b>	<b>Grade 3</b>	<b>Grade 4</b>
<b>Glandes salivaires</b>	Sans changement	Légère sécheresse de la bouche / bonne réponse à la stimulation	Sécheresse modérée de la bouche / absence de réponse à la stimulation	Sécheresse complète de la bouche / absence de réponse à la stimulation	Fibrose
<b>Moelle épinière</b>	Sans changement	Syndrome de l'Hermitte modéré	Syndrome de l'Hermitte sévère	Signes neurologiques objectifs au niveau ou sous-jacents à la région irradiée	Mono- ou Para- ou Tétraplégie
<b>Cerveau</b>	Sans changement	Migraine modérée / légère léthargie	Migraine modérée / léthargie importante	Migraine sévère / dysfonction du Système Nerveux Central, parésie ou dyskinésie	Convulsion ou paralysie / coma
<b>Yeux</b>	Sans changement	Cataracte asymptomatique / ulcération cornéenne / ulcération ou kératite mineure	Cataracte symptomatique / ulcération cornéenne modérée/ rétinopathie ou glaucome mineur	Kératite sévère / rétinopathie sévère ou décollement glaucome sévère	Panophtalmie / cécité
<b>Larynx</b>	Sans changement	Dysphonie légère / œdème aryénoïde	Œdème de l'aryénoïde modéré / chondrite	Œdème sévère / chondrite sévère	Nécrose
<b>Peau</b>	Sans changement	Légère atrophie / changement de pigmentation / perte de la pilosité	Atrophie en plaque / télangiectasies modérées / épilation totale	Atrophie marquée / télangiectasies nombreuses	Ulcération
<b>Tissus sous cutanés</b>	Sans changement	Légère induration (fibrose) / perte de tissu adipeux sous cutané	Fibrose modérée mais asymptomatique / rétraction légère (< 10% de réduction linéaire)	Induration sévère / perte du tissu sous cutané / rétraction sévère (> 10% de réduction linéaire)	Nécrose
<b>Muqueuses</b>	Sans changement	Légère atrophie / sécheresse	Atrophie modérée et télangiectasie muqueuse	Atrophie marquée avec sécheresse complète / sévère télangiectasie	Fibrose

**Tableau N°II : d'après RTOG / EORTC - cotation de la morbidité tardive induite par la radiothérapie [44]**

### 3.2.2. Séquelles osseuses et ostéoradionécrose

#### 3.2.2.1. Effets de la radiothérapie sur l'os

- La radiothérapie altère les **cellules osseuses** : ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes. Une atteinte cellulaire directe est observée avec une baisse de l'activité des ostéocytes et des ostéoblastes [45]. Les ostéoclastes sont sensibles et présentent également une baisse de leur activité ; cette baisse d'activité précéderait l'hypocellularité également observée après une irradiation. Gal et Coll. ont montré que l'irradiation d'ostéoblastes de souche MC3T3-E1 de souris *in vitro* entraînait une diminution de la prolifération cellulaire, une réduction dose-dépendante de la production de collagène et une augmentation de l'expression des récepteurs de facteurs de croissance transformant bêta  $\beta$  I et II (TGF $\beta$  I et II) [46]. Dudziak et Coll. ont également montré que l'irradiation d'ostéoblastes MC3T3-E1 entraînait une diminution dose-dépendante de la prolifération cellulaire, favorisait la différenciation cellulaire, et entraînait une diminution de la production de TGF $\beta$  I et du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) [47]. Le VEGF est une cytokine considérée comme indispensable à la formation et au maintien de l'intégrité vasculaire. La diminution de la production de TGF $\beta$  I serait liée à une diminution de la production par les cellules elles-mêmes ; la diminution de la production de VEGF serait secondaire à la diminution de la prolifération cellulaire. Ces effets cellulaires peuvent ainsi expliquer une relative déminéralisation d'un os irradié.
- La radiothérapie agit sur la **moelle osseuse** [48-51]. Une myélosuppression prolongée est observée après une irradiation corporelle totale et constitue ainsi un facteur dose-limitant de traitement. Les radiations ionisantes agissent sur les cellules de la moelle osseuse avec en particulier une atteinte des cellules souches. Hors, ces cellules sont à l'origine des cellules osseuses : les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) produisent des ostéoblastes ; les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) sont à l'origine des ostéoclastes [52]. Le stroma médullaire est également le siège de remaniements post-radiques sous forme d'une fibrose médullaire.
- La radiothérapie altère la **vascularisation osseuse**. Les radiations ionisantes induisent une athéromatose vasculaire, phénomène qui induit une hypovascularisation. Cette

hypovascularisation a été mise en évidence par des mesures de teneur en oxygène des tissus irradiés en comparaison avec des tissus sains [53]; par ailleurs, cette hypovascularisation augmenterait progressivement avec le temps. Hopewell et Coll. ont démontré la réduction du flux vasculaire au sein de l'os mandibulaire irradié à partir d'une irradiation de 20 Gy [54]. Une diminution post-radique de la production de VEGF a été observée et serait secondaire à la diminution de la prolifération cellulaire [47].

- La radiothérapie altère le **métabolisme osseux**, le **remodelage osseux** et les **propriétés de cicatrisation osseuse**. Ces altérations sont en partie expliquées par l'hypocellularité radio-induite. La carence du système microvasculaire local contribuerait aux altérations de cicatrisation d'un os irradié [55]. La cicatrisation osseuse, lorsqu'elle se produit, se fait sous la forme d'une fibrose par la multiplication des fibroblastes. Cette cicatrisation est par ailleurs le plus souvent retardée. Ces altérations de cicatrisation ont également été retrouvées chez l'animal. Arnold et Coll. ont montré qu'une irradiation préopératoire, délivrée entre un jour et 6 mois avant la chirurgie, diminuait la cicatrisation osseuse ; une irradiation postopératoire, délivrée les 3 premiers jours après la chirurgie, présentait une cicatrisation semblable à celle d'une irradiation préopératoire ; enfin, une irradiation postopératoire, débutée au moins 4 jours après la chirurgie, ne réduisait pas la cicatrisation osseuse, même avec de très fortes doses [56,57]. Certains auteurs ont proposé l'utilisation de radiations ionisantes afin de prévenir l'apparition de calcifications ectopiques [58-61].
- La radiothérapie altère les **propriétés mécaniques osseuses**. Une réduction de la résistance de l'os à la fracture et à la torsion est observée. L'os est mécaniquement fragilisé après irradiation. Savostin-Asling et Silverman ont observé que les micro-fractures mandibulaires observées chez des patients irradiés n'avaient aucune tendance à la cicatrisation spontanée [62]. Widmann et Coll. ont étudié et testé la résistance à la torsion d'un fémur fracturé après une irradiation localisée de 9 Gy ; le processus de cicatrisation est retardé et la résistance inférieure vis à vis des os contrôles non irradiés [63]. Ces résultats sont également retrouvés par l'équipe de Pelker sur un modèle de fracture pré et postradique [64]. Une ostéopénie et une diminution de 10 à 25% de la densité osseuse au niveau du tissu osseux d'enfants soumis à une irradiation thérapeutique ont été rapportées [54]. Les facteurs influençant cette atrophie osseuse ne sont pas clairement établis, mais il



semblerait que les altérations vasculaires radio-induites et les effets des radiations ionisantes sur les ostéoblastes en soient à l'origine.

- Enfin, la radiothérapie altère la **croissance osseuse** [65]. La sévérité des effets des radiations ionisantes sur la croissance osseuse est fonction de la dose, du champ d'irradiation et de l'âge de l'enfant. La dose critique, variable selon les auteurs se situe entre 15 et 30 Gy. La radiothérapie induit un effet sur tous les lieux de croissance (cartilage en croissance, périoste, suture et os alvéolaire). Des phénomènes de compensation par les structures voisines de l'os irradié sont observés (apposition périostée).

#### 3.2.2.2. Ostéoradionécrose

Le développement d'une ostéoradionécrose constitue une des séquelles majeures et des plus redoutées lors d'une irradiation cervico-faciale [4,5].

- L'ORN ou ostéite post-radique résulte d'un déséquilibre complexe des mécanismes homéostatiques et métaboliques provoqués par un trauma issu de radiations ionisantes. Une dévitalisation et une dévascularisation de l'os sont observées. L'ORN se **définit** par la formation d'une lésion chronique qui ne guérit pas sans intervention et qui se caractérise par une dénudation osseuse prolongée ainsi que par une lyse osseuse décelable à l'examen radiologique.
- Les **données épidémiologiques** de l'ORN montrent une fréquence des ORN très variable selon les auteurs, entre moins de 1% et plus de 20% [66]. Ces différences sont liées aux modalités de recrutement des équipes et surtout à l'ancienneté de la série. L'ORN semble rare pour des doses inférieures à 60 Gy et elle semble augmentée lorsque la radiothérapie est associée à une chimiothérapie. L'os le plus touché est la mandibule, 24 fois plus que le maxillaire ; certains auteurs ont également rapporté des cas d'ORN concernant la clavicule, le pelvis, la tête fémorale [67]...
- La **physiopathologie** de l'ORN reste controversée. L'ORN est caractérisée par la formation de tissus hypovasculaires, hypoxiques et hypocellulaires entraînant une

destruction cellulaire puis une lésion chronique qui ne guérit pas (théorie des « 3H » de Marx [68]). Selon Marx en 1983, il n'y aurait pas de colonisation bactérienne dans les lésions profondes de l'ORN dans 70% des cas étudiés ; les micro-organismes ne joueraient qu'un rôle mineur dans l'ORN et ne constitueraient que des contaminants de surface [68]. Ainsi, les théories des « 3H » de Marx [68] et des « 2I » de Dambrain (Ischémie et Infection) [69] s'opposent sur l'infection, mais s'accordent sur l'ischémie et l'hypovascularisation. Actuellement, l'hypothèse la plus souvent rapportée est l'altération du système vasculaire, initiée par une diminution des connexions vasculaires à l'origine de thromboses veineuses [55].

- L'ORN se caractérise par des **signes cliniques** objectifs et subjectifs. Les signes objectifs sont une ulcération de la muqueuse, une nécrose tissulaire et un os sous-jacent dénudé ; une faible proportion de patients présentent un os atteint sous une muqueuse saine. Les signes subjectifs de l'ORN sont représentés par une douleur, très variable en fonction du stade de gravité de l'ORN. Les **signes radiologiques** d'une ORN sont également très variables. Une densification osseuse, un épaississement périosté, des zones de raréfaction osseuse, une zone de séquestre, une zone d'ostéomyélite ou une fracture pathologique peuvent être observés. Ces manifestations radiologiques peuvent apparaître après une période de latence.
- L'**évolution** d'une ORN peut être dramatique d'un point de vue fonctionnel et parfois même vitale. Elle peut se compliquer d'un trismus, d'une infection de la muqueuse, d'une formation de fistule, interne et/ou externe (= orostome), d'une séquestration, d'une fracture spontanée et de modifications de la sensibilité (douleurs aiguës, paresthésies ou anesthésies).
- Le **traitement curatif** d'une ORN est long, difficile et dépend de l'extension de la lésion. Avant tout traitement, une biopsie est effectuée pour réaliser un diagnostic différentiel avec une récurrence tumorale. Il comporte un traitement médical (bains de bouche, antibiotiques et antalgiques) et un traitement chirurgical. Une intervention chirurgicale conservatrice avec résection non interromptrice de la mandibule peut être encore envisagée lors d'une ORN récente avec une extension limitée à l'os alvéolaire ; lors d'une ORN extensive, la résection mandibulaire classique interromptrice doit être envisagée [6]. L'utilité d'une oxygénothérapie hyperbare est controversée [70-72].

### **3.3.Impact de la radiothérapie sur les thérapeutiques odontologiques et oto-rhino-laryngologiques**

#### **3.3.1. Avulsions dentaires en terrain irradié**

Autrefois, toutes les dents dans le futur champ d'irradiation étaient extraites avant une irradiation cervico-faciale. Depuis l'apport de la fluoroprofylaxie, une attitude plus conservatrice est proposée lorsque le patient présente une bonne hygiène bucco-dentaire [12,73].

Un nouveau problème est ainsi apparu, celui des avulsions dentaires en terrain préalablement irradié [11]. En effet, l'altération post-radique de la cicatrisation osseuse constitue le problème des ces extractions dentaires. Les avulsions dentaires post-radiques nécessitées par des lésions parodontales ou carieuses représentent un facteur significatif dans le déclenchement d'une ORN. Le risque est très important dans les 6 mois qui suivent la radiothérapie et continue d'augmenter dans le temps tant que la vascularisation et la perfusion des tissus diminuent et que la fibrose progresse.

Différents protocoles d'avulsions dentaires ont été proposés pour réduire ce risque d'ORN [10,12,74]. Actuellement, le protocole préconisé est le suivant : les dents doivent être extraites de façon non traumatisante, avec régularisation des crêtes alvéolaires, sutures hermétiques discontinues, mise en place d'une colle biologique (type Tissu Coll®) et antibioprophylaxie. L'anesthésie générale, la mise en place d'une sonde gastrique et l'oxygénothérapie hyperbare sont également recommandées par certains auteurs. Malgré ces précautions, le déclenchement d'une ORN est toujours possible.

Carl et Coll. se sont intéressés à l'utilisation de substituts osseux synthétiques associés à de la tétracycline pour combler les alvéoles après extraction en territoire irradié [75]. Les résultats montrés semblent prometteurs, l'utilisation de cette association reste cependant anecdotique, l'étude ayant été réalisée chez 8 patients.

### 3.3.2. Implantologie en terrain irradié

L'apport de l'implantologie pour les reconstructions prothétiques intra- et extra-orales est indéniable. Elle permet la fixation mécanique de ces prothèses dentaires et épithèses. Chez les patients édentés, la tenue et la fonctionnalité des prothèses dentaires sont aléatoires, en particulier lors d'une asialie ; l'utilisation d'implants intra-oraux permet l'obtention de la triade : rétention, stabilisation et sustentation de ces prothèses dentaires. Les implants extra-oraux évitent l'aménagement chirurgical de cavités rétentes [13], l'utilisation de colles adhésives ou de montures de lunettes ; ils améliorent le positionnement et l'entretien des épithèses et permettent une immobilité de celles-ci lors des mouvements de la tête.

En 1977, Brånemark définit le concept d'ostéointégration comme l'existence d'un contact direct entre un os vivant et un implant métallique ou encore comme la jonction anatomique et fonctionnelle directe entre l'os vivant et la surface d'un implant mis en charge [76].

Les effets de l'irradiation sur l'ostéointégration d'implants sont peu référencés dans la littérature. Brogniez et Coll. ont montré chez des chiens Beagle qu'un os néoformé de type fibreux, réticulé suivi d'une apposition d'os lamellaire était observé dans 96% des cas autour d'implants posés 6 mois après une irradiation [77]. Larsen et Coll. ont montré chez des lapins irradiés au niveau des tibias une ostéointégration clinique et radiologique des implants ; néanmoins, l'analyse histologique a également montré la présence d'une interposition fibreuse entre l'os et l'implant, signe d'une biotolérance plutôt que d'une véritable ostéointégration [78].

La véritable ostéointégration d'implants ne peut être effectivement confirmée que par l'histologie. L'implantologie en territoire irradié est confrontée à divers problèmes et risques : le retard de cicatrisation, l'absence d'ostéointégration des implants et le déclenchement d'une ORN [79]. Le terme de « survie » ou de « succès » d'un implant est utilisé lorsque celui-ci est cliniquement ostéointégré. La comparaison de différentes études portant sur des implants extra- et/ou intra-oraux reste délicate en raison de l'existence de nombreux paramètres : dose et champ d'irradiation, taille de l'échantillon, délai entre radiothérapie et implantation, ...

### 3.3.3. Exérèse et reconstruction chirurgicales en terrain irradié

Les exérèses chirurgicales en territoire irradié peuvent être liées au traitement d'une récurrence tumorale ou bien d'une ORN [6]. La nécessité de telles interventions en territoire préalablement irradié pose le problème de la reconstruction chirurgicale. Diverses techniques peuvent être envisagées en fonction de l'état local, locorégional et général du patient :

- Les **lambeaux de couverture**. Ces techniques sont envisagées soit lorsque la chirurgie n'est pas interruptrice soit lorsque le patient ne peut bénéficier d'une intervention chirurgicale longue ou que le réseau vasculaire est insuffisant. Les résultats fonctionnels et esthétiques lors d'une chirurgie interruptrice sont d'autant moins bons que l'interruption est centrale.
- Les **attelles ou plaques de reconstruction**. Cette technique utilise une plaque ou attelle de reconstruction en titane. Elle présente l'avantage d'être rapide et peut donc être proposée aux patients fragiles d'un point de vue anesthésique [80]. Il ne s'agit pas de la méthode donnant les meilleurs résultats. Elle est utilisée avec succès dans les reconstructions immédiates après résection tumorale mais donne de mauvais résultats lors du traitement de l'ORN. Elle expose au risque d'extrusion secondaire de la plaque et un lambeau de couverture doit être associé.
- Les **greffes osseuses libres non vascularisées**. Ces techniques présentent un taux d'échecs majeur en raison du faible potentiel de cicatrisation du lit receveur, elles sont donc largement déconseillées en territoire préalablement irradié.
- Les **greffes osseuses libres microanastomosées**. Ces techniques représentent la solution idéale dans le traitement chirurgical interrupteur d'une ORN [6,81]. De nombreux types de reconstructions sont envisagés, le lambeau de fibula vascularisé par un pédicule constituant le traitement de choix de la reconstruction mandibulaire. Ces lambeaux apportent une vascularisation osseuse riche et leur fixation est réalisée par des plaques d'ostéosynthèse. Cependant, ces lambeaux présentent également des inconvénients liés à

la morbidité du site donneur (le réseau vasculaire laissé en place doit être parfaitement perméable) et à un taux de thromboses élevé du fait de la mauvaise qualité vasculaire du site receveur [7]. Par ailleurs, ces techniques sont chirurgicalement complexes, longues d'un point de vue anesthésique, et nécessitent généralement la mobilisation de deux équipes chirurgicales.

Les greffes osseuses en territoire préalablement irradié se compliquent de thromboses, de retards de cicatrisation, d'absences d'ostéointégration et de pseudarthroses chez l'homme [7,9] et chez l'animal [8,82,83]. Depuis de très nombreuses années, les chercheurs et cliniciens se sont intéressés à une alternative à ces greffes osseuses.

## 4. LES TECHNIQUES DE RECONSTRUCTION ET SUBSTITUTS OSSEUX

---

### 4.1. Généralités

Le tissu osseux présente de nombreuses fonctions, mécaniques et biologiques, parmi lesquelles :

- une **fonction mécanique** de résistance aux contraintes exercées sur le squelette osseux, de soutien, et de locomotion,
- une **fonction métabolique** au niveau de l'équilibre phosphocalcique de l'organisme,
- une **fonction de formation cellulaire** grâce à la moelle osseuse,
- une **fonction hématopoïétique** au niveau de la moelle osseuse,
- et une **fonction de stockage énergétique** grâce aux lipides situés dans la moelle jaune et constituant une réserve importante d'énergie.

Le traitement des défauts osseux de grand volume est réalisé par greffe osseuse ou par apport de biomatériaux qui ont pour fonction de consolider ou de remplacer l'os manquant afin de recouvrer ces différentes fonctions.

### 4.2. Les greffes osseuses

Les greffes osseuses ont toutes un potentiel ostéogénique variable en fonction du type de greffe. Ce potentiel peut être intrinsèque (présence de cellules ostéogéniques au sein de la greffe) ou bien être initié par des phénomènes d'ostéoconduction et/ou d'ostéoinduction.

On distingue trois types de greffes osseuses [84] :

- Les **autogreffes** proviennent du sujet lui-même. Il s'agit d'un prélèvement osseux avasculaire frais réalisé au niveau d'un second site opératoire et placé pendant l'intervention dans le site osseux à combler chez le même patient. Les greffons osseux

trabéculaire ou corticaux sont prélevés au niveau de la crête iliaque, du tibia, de la fibula, des côtes ou de la symphyse mentonnière. Les autogreffes présentent une absence de réaction de rejet et un fort potentiel ostéogénique (présence de cellules et de facteurs ostéogéniques). Ces greffes présentent cependant la nécessité d'un second site opératoire, source de complications, d'une augmentation du temps opératoire et d'une certaine morbidité du site donneur [85] ; par ailleurs, la quantité de greffon est limitée et peu de cellules présentes au sein du greffon survivent à l'intervention. Malgré tout, les autogreffes demeurent le standard dans le comblement de défauts osseux ; ce matériau est le plus anciennement et le plus couramment utilisé dans ce domaine.

- Les **allogreffes** proviennent d'un sujet différent du sujet receveur, mais de son espèce. Le prélèvement et la mise en place du greffon ne se font pas dans le même temps opératoire. La réalisation des allogreffes nécessite l'existence de banques de tissus osseux permettant leur préparation et leur conservation [86]. Ces greffes présentent un faible coût, une importante disponibilité de tissu et l'absence de second site opératoire (absence de morbidité associée). Ces greffes présentent cependant un double risque : elles peuvent être d'une part à l'origine de réactions immunologiques inflammatoires et de rejet ; elles peuvent être d'autre part à l'origine de transmission d'agents infectieux au sujet receveur (virus, bactéries, agents non conventionnels, ...), malgré une sélection stricte des donneurs, des analyses biologiques et des périodes de quarantaine [87]. Ces greffes présentent également l'inconvénient d'être un greffon osseux non vivant, avec une résorption rapide et des propriétés biologiques variables en fonction des donneurs.
- Les **xénogreffes** sont des greffes provenant d'un animal. Elles présentent un risque de contamination infectieuse et de réaction inflammatoire importante. Par ailleurs, ces greffes présentent également le problème de la compatibilité immunologique. De ce fait, les xénogreffes ne sont plus utilisées pour la réparation de pertes de substance.

La greffe osseuse autologue constitue théoriquement le matériau de comblement idéal grâce à ses propriétés ostéogéniques et à l'absence de rejet. Cependant, les problèmes liés au prélèvement du greffon, au manque d'os disponible et à l'augmentation du temps d'intervention chirurgicale ont favorisé le développement et l'emploi de substituts osseux.



### 4.3. Les substituts osseux

#### 4.3.1. Propriétés des substituts osseux

##### 4.3.1.1. Définitions

Selon Osborn en 1980 [88], les biomatériaux osseux peuvent être classés en trois groupes :

- les **matériaux biotolérés** sont des matériaux séparés du tissu osseux par du tissu fibreux (ex : ciment polyacrylique),
- les **matériaux bioinertes** sont des matériaux en contact direct avec le tissu osseux, mais avec une interface bien définie (ex : titane),
- et les **matériaux bioactifs** sont des matériaux permettant la formation d'un os nouveau avec une interface diffuse et dynamique (ex : phosphate de calcium). La bioactivité est la possibilité d'interactions et d'échanges favorables avec les fluides biologiques, les cellules et les tissus vivants, et la possibilité d'induire des modifications biologiques. Parmi ces matériaux bioactifs, certains sont ostéoconducteurs, d'autres ostéoinducteurs.

##### 4.3.1.2. Propriétés structurales et mécaniques

La **porosité** conditionne le comportement du biomatériau, tant pour la néoformation osseuse que pour ses propriétés biomécaniques [89-91]. La porosité présente une influence sur le phénomène de résorption/substitution osseuse du biomatériau. Le taux de porosité est le rapport du volume des espaces vides de matière sur le volume global du biomatériau.

Deux types de porosités sont retrouvés :

- La **microporosité** correspond aux pores de moins de 10  $\mu\text{m}$ . Elle est liée aux espaces qui existent entre les cristaux du biomatériau. Elle permet la circulation des fluides biologiques et les échanges entre ces fluides et le substitut osseux [92].

- La **macroporosité** correspond aux pores de plus de 100 µm. Elle correspond à l'existence de pores calibrés et induits au cours de la calcination par adjonction d'un porogène (ex : naphthalène [93], sucre ou eau oxygénée). Cette macroporosité peut être contrôlée en faisant varier le diamètre et la quantité des pores (variation de la quantité du « porogène » et de sa taille). Elle permet la colonisation osseuse et la néovascularisation jusqu'au cœur du biomatériau. La macroporosité influence les propriétés mécaniques du biomatériau : plus elle est importante, plus les propriétés mécaniques sont faibles ; cependant les capacités à être colonisé par le tissu osseux sont de ce fait plus importantes [92].

#### 4.3.1.3. Propriétés biologiques

- La **biocompatibilité** est la propriété d'un biomatériau à ne pas entraîner d'effet néfaste pour le receveur et à ne pas empêcher une différenciation correcte des tissus environnants.
- La **néoformation osseuse** :
  - L'**ostéogenèse** est définie comme un mécanisme de cicatrisation osseuse spontanée observé lors d'une fracture ou d'un défaut de taille non critique (un défaut osseux de taille critique ne peut pas se réparer spontanément).
  - L'**ostéoconduction** est définie comme la propriété passive d'un matériau à promouvoir la repousse osseuse par invasion vasculaire et cellulaire à partir des berges du tissu osseux hôte. Le biomatériau sert de charpente à la néoformation osseuse.
  - L'**ostéoinduction** est définie comme la capacité d'un matériau à recruter les cellules souches mésenchymateuses environnantes et à induire leur différenciation pour synthétiser une matrice puis la minéraliser. Ce mécanisme est induit par la présence de facteurs ostéogéniques à leur surface.
- La **biodégradation/biorésorption** : des interactions se produisent dans les macropores entre le matériau et les cellules ; elles s'expriment par la dégradation du biomatériau. Cette dégradation peut être liée aux cellules de type ostéoclastique ou macrophagique.

- La **biofonctionnalité** : elle évalue les capacités du matériau à assurer la fonction qui lui est demandée. Elle constitue une preuve de l'efficacité du matériau et de son intégration biologique et dépend des caractéristiques physico-chimiques du biomatériau.

Les matériaux de substitution osseuse à notre disposition pour la réparation osseuse se présentent sous la forme de biomatériaux d'origine biologique, naturelle, ou de substituts osseux synthétiques.

#### **4.3.2. Les substituts osseux d'origine biologique**

Les substituts osseux d'origine biologique sont représentés par l'os bovin céramisé [94] et le corail [95,96].

Le corail naturel est constitué de carbonate de calcium à 99%. Il est biocompatible, il serait résorbable et ostéoinducteur [96]. Les substituts commercialisés ont subi des traitements afin de garantir la sécurité de leur composition.

L'os bovin céramisé est produit à partir du fémur et de l'humérus de bœuf. Ces os subissent une transformation industrielle de céramisation qui permet une déprotéinisation complète de l'os. Elle supprime le risque infectieux et l'antigénicité de ce tissu [94].

#### **4.3.3. Les substituts osseux d'origine synthétique**

##### **4.3.3.1. Généralités**

Les inconvénients et limites des greffes osseuses et des substituts osseux d'origine biologique ont encouragé la recherche expérimentale ainsi que l'utilisation de substituts osseux d'origine synthétique.

Ces matériaux présentent des propriétés, des indications et des résultats cliniques variables d'un substitut à un autre. Dans les années 70, des matériaux plus proches de la phase minérale de l'os ont été développés pour le comblement de défauts osseux : les phosphates de calcium ou biocéramiques phosphocalciques [15].

### 4.3.3.2. Les biocéramiques phosphocalciques

#### 4.3.3.2.1. Généralités

Les phosphates de calcium ont été rapidement employés comme matériaux synthétiques de substitution osseuse ; ils sont actuellement largement utilisés en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale et dentaire [14,15]. Les phosphates de calcium présentent une composition proche de celles des phases minérales des tissus calcifiés des vertébrés [14]. Les phases minérales des tissus calcifiés (os, émail et dentine) sont des apatites phosphocalciques non stochiométriques et polysubstituées.

Les phosphates de calcium existent sous diverses formes : en blocs, en granules ou en poudres ; ils sont injectables ou non, durcissants ou non.

Les principaux phosphates de calcium utilisés comme matériaux de remplacement du tissu osseux sont l'hydroxyapatite (HA), le phosphate tricalcique bêta ( $\beta$ TCP) et le phosphate de calcium biphasé (BCP) [15].

#### 4.3.3.2.2. Le phosphate de calcium biphasé BCP

Le phosphate de calcium biphasé, ou Biphasic Calcium Phosphate (BCP), est ainsi un mélange d'HA et de  $\beta$ TCP [15].

#### ❖ Composition du BCP

- L'**hydroxyapatite**  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  est le premier phosphate de calcium à avoir été utilisé comme biomatériau de substitution osseuse. Il présente un rapport Ca/P de 1,67. L'HA possède de bonnes propriétés mécaniques et une structure très proche de celle de l'os [97]. Un phénomène d'ostéocoalescence (intégration très étroite entre le biomatériau et l'os néoformé) est observé après implantation : les cristaux d'apatite croissent sous l'effet des fluides biologiques et favorisent la minéralisation de la matrice extra-cellulaire. L'HA est peu soluble et présente une cinétique de résorption très lente *in vivo*.

- Le **phosphate tricalcique bêta**  $[Ca_3(PO_4)_2]$  présente un rapport Ca/P de 1,5. Il possède une plus grande solubilité et est donc plus dégradable que l'HA *in vitro* et *in vivo*. L'augmentation locale des concentrations en ions calcium et phosphate induit une précipitation de ces ions sous la forme d'une apatite biologique favorisant la minéralisation de la matrice extra-cellulaire.
- Le **phosphate de calcium biphasé** est l'association des deux biomatériaux précédents. Il peut être obtenu de deux façons : soit en phase solide à partir des phases phosphocalciques sous l'action de la température, soit par précipitation en milieu aqueux de sels de calcium sous l'action de sels de phosphates. Les poudres sont mises en forme et subissent un « frittage » (traitement thermique permettant l'obtention d'une céramique, composé massif et biphasé). Ces matériaux sont disponibles sous de nombreuses formes galéniques (poudres, granules et blocs) et géométriques (coins d'ostéotomie, inserts de cages vertébrales).

#### ❖ Propriétés chimiques, biologiques et structurales du BCP

- Les phosphates de calcium biphasés sont des matériaux synthétiques biocompatibles.
- La porosité est une caractéristique physique essentielle du BCP, jouant un rôle prépondérant dans ses propriétés mécaniques et biologiques [89]. Le taux de porosité (= rapport du volume des espaces vides de matière sur le volume global du biomatériau) conditionne le comportement du biomatériau, tant pour la néoformation osseuse que pour les propriétés biomécaniques.
- Les inconvénients majeurs de ces biomatériaux sont représentés par une fragilité et une faible résistance mécanique à la déformation donc leur interdiction en zone de contrainte sans ostéosynthèse ou immobilisation complémentaire associée.
- Les propriétés de solubilité et de résorption sont intermédiaires entre les proportions d'HA et de  $\beta$ TCP [98] ; l'adoption d'un bon compromis permet d'assurer le phénomène de biodégradation de l'implant à la cinétique de remodelage osseux local (= bioactivité contrôlée) [98]. Le processus physiologique de remodelage osseux est rendu possible par la propriété de biodégradabilité du BCP (très faible pour l'HA, élevée pour le  $\beta$ TCP et intermédiaire pour le BCP, dans des proportions dépendant du rapport HA/ $\beta$ TCP). Les

céramiques phosphocalciques ne sont pas considérées comme ostéoinductrices [99], même si certains auteurs ont mis cette propriété en évidence : certaines observations de néoformation osseuse ont été faites au sein de céramiques macroporeuses dans des implantations en site ectopique [100,101].

- Actuellement les céramiques phosphocalciques ne répondent que partiellement aux impératifs de biofonctionnalité. En effet, la biofonctionnalité initiale est incomplète, ces céramiques restaurent uniquement et imparfaitement la fonction mécanique [89]. La fonction médullaire hématopoïétique n'est rétablie qu'au fur et à mesure du remodelage osseux. Le phénomène de résorption/substitution rend ensuite possible le rétablissement total de toutes les fonctions osseuses.

### **4.3.3.3. Les substituts osseux injectables**

#### 4.3.3.3.1. Généralités

Le développement de substituts osseux injectables a pour objectif de disposer de biomatériaux possédant les mêmes propriétés biologiques que les céramiques phosphocalciques, mais présentant une plus grande facilité d'emploi et de manipulation. Ces biomatériaux doivent également permettre de limiter l'importance de certaines interventions chirurgicales en permettant des comblements à partir d'une voie d'abord réduite et en diminuant le temps opératoire.

Ainsi, deux types de biomatériaux injectables ont été développés : les ciments ioniques et les substituts osseux injectables.

Les ciments ioniques sont constitués d'une phase liquide (en général de l'eau) et d'une phase solide (poudre de céramique phosphocalcique) mélangées juste avant implantation [102]. Ces deux phases confèrent un caractère injectable au biomatériau, puis entraînent un durcissement *in situ*.

Un substitut osseux injectable a été développé dans notre laboratoire : Injectable Bone Substitute ou IBS et a fait l'objet de dépôt de brevet [103].

#### 4.3.3.3.2. Le substitut osseux injectable IBS

##### ❖ Composition de l'IBS

L'IBS est un matériau de comblement osseux qui associe une phase minérale à une phase vectrice organique, mais qui ne durcit pas après injection [98,104].

- La **phase minérale** est constituée de granules de BCP. Le type de granulométrie choisi est fonction des indications thérapeutiques (40-80, 200-500  $\mu\text{m}$ , ...).
- La **phase vectrice**, ou solution aqueuse de polymère, est constituée d'une solution visqueuse d'Hydroxy-Propyl-Méthyl-Cellulose (HPMC) dans une solution physiologique isotonique. Il s'agit d'un dérivé cellulosique appartenant à la famille des méthylcelluloses. L'HPMC est obtenue par réaction d'un mélange de chlorure de méthyle et d'oxyde de propylène avec de l'alcali cellulose. L'HPMC se présente sous la forme de poudre fibreuse ou granuleuse (couleur blanche). Il s'agit d'un composé non-ionique, hydrophile. Une période de 48 à 72 heures est nécessaire pour obtenir une viscosité stable lorsqu'il est mis en solution. L'HPMC présente des propriétés intéressantes : bon rétenteur d'eau, pouvoir filmogène et pouvoir liant.
- L'obtention du composite IBS s'obtient en mélangeant l'HPMC en solution aqueuse à 2 ou 3% avec les granules de BCP. Le mélange s'effectue par spatulation manuelle douce dans des rapports massiques HPMC/BCP de 48/52 à 53/47. Le résultat obtenu est une pâte consistante de couleur blanche, conditionnée en seringue à usage unique « prête à l'emploi », sous sachet hermétiquement clos ; ce dernier est ensuite autoclavé.

##### ❖ Propriétés chimiques, biologiques et structurales de l'IBS

- Ce matériau est biocompatible, bioactif et biorésorbable.
- L'IBS est un biomatériau injectable. Il a la particularité de parfaitement se mouler aux pertes de substances osseuses créées. Par ailleurs, il permet une chirurgie moins invasive [104-106].

- Il permet la création d'une matrice permettant une ostéogenèse importante en favorisant la colonisation cellulaire [90,91,106-108]. L'interaction du polymère avec les granules de BCP crée des espaces interparticulaires qui facilitent la circulation des fluides biologiques, et l'activation des cellules permet la colonisation du matériau par un tissu osseux différencié bien minéralisé [105,109,110]. Le vecteur cellulosique disparaît et la résorption lente de la phase minérale va de pair avec la réhabilitation centripète du biomatériau par l'os néoformé [91].
- L'inconvénient majeur est que ce matériau ne possède pas de propriétés mécaniques comme les céramiques phosphocalciques car il ne durcit pas après implantation *in vivo*.

## **4.4.Substituts osseux et irradiation**

### **4.4.1. Influence du substitut osseux sur la délivrance du rayonnement**

Les radiations ionisantes lors d'une irradiation thérapeutique pénètrent les différentes structures anatomiques. La progression de ces radiations ionisantes dépend de la densité et de la nature des tissus traversés.

L'hydroxyapatite peut être considérée comme un matériau implantable en site osseux ne modifiant pas la dose de radiations ionisantes délivrées aux différentes structures traversées. En effet, certains travaux expérimentaux ont montré que l'HA implantée n'entraînait pas de modifications significatives du faisceau d'irradiation incident [17]. Par ailleurs, une étude menée sur des pièces anatomiques osseuses humaines irradiées par des photons de Cobalt 60 a montré que les doses d'irradiations absorbées étaient proches de celles de l'HA synthétique [16].

L'utilisation d'implants en titane semble modifier de façon plus importante les doses d'irradiation délivrées [111]. En effet, certains auteurs ont montré la présence d'un effet de rétro-diffusion entraînant un « surdosage » en avant de l'implant et un « sous-dosage » en arrière de celui-ci. Cette dose serait augmentée de 10 à 15% à 1 mm en avant de l'implant. Néanmoins, la dépose d'implants dentaires en titane avant une irradiation cervico-faciale n'est plus de mise actuellement si l'implant est parfaitement ostéointégré ; en effet, leur dépose entraînerait un délabrement osseux trop important retardant le délai avant le début de la radiothérapie.



Stenson et Coll. ont comparé les effets de divers biomatériaux implantables sur la dosimétrie de radiations ionisantes confirmant que l'HA montrait un effet relativement mineur sur la distribution de la dose d'irradiation en comparaison avec les métaux étudiés (titane pur, alliage de titane et acier inoxydable) [112].

#### **4.4.2. Ostéointégration en milieu irradié**

Pinholt et Coll. ont montré qu'une irradiation cervico-faciale de 40 Gy par des photons du Cobalt 60 chez des chiens ne modifiait pas de façon significative ni la dissolution des granules d'HA implantés 4 mois avant irradiation, ni la réaction inflammatoire, ni l'ostéointégration du biomatériau [113].

Kudo et Coll. ont montré chez des lapins qu'une irradiation mandibulaire d'une unique dose de 15 Gy au Cobalt 60, débutée très tôt après l'implantation, inhibait le contact direct entre les implants à base d'HA et l'os environnant ; néanmoins, un contact osseux déjà établi avant l'irradiation était peu affecté par les radiations ionisantes [17].

Schoen et Coll. ont rapporté un taux de succès relativement élevé (90,5%) lors d'une implantation pré-radiothérapique d'implants, et recommandent ainsi l'insertion d'implants immédiatement après la chirurgie carcinologique [79]. De la même façon, Brogniez et Coll. ont également montré dans un modèle expérimental canin l'intégration possible d'implants avant une irradiation thérapeutique [114].

Les greffes osseuses et les matériaux de substitution osseuse constituent deux stratégies à la disposition des chirurgiens pour combler une perte de substance osseuse. Depuis plusieurs années, l'association de cellules de moelle osseuse à un substitut osseux phosphocalcique est proposée pour améliorer cette substitution.

## 5. INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

---

### 5.1.Définition

L'ingénierie tissulaire consiste en l'association de cellules, matrices et biomolécules.

L'objectif final de l'ingénierie tissulaire osseuse est de régénérer localement le tissu osseux.

### 5.2.Les différentes associations

L'ingénierie tissulaire osseuse repose sur l'association possible de divers éléments :

- la **matrice**, support de la régénération osseuse, peut être conçue à partir de protéines de la matrice extra-cellulaire, comme de la fibrine, ou à partir des biocéramiques phosphocalciques,
- les **cellules ostéocompétentes** issues de la moelle osseuse totale ou représentées par les cellules souches mésenchymateuses (CSMs),
- et enfin, les **facteurs ostéogéniques** : ces molécules jouent un rôle primordial dans le contrôle de la différenciation ostéoblastique et dans l'activité des cellules du tissu osseux ; ces facteurs sont essentiellement produits par les ostéoblastes et sont incorporés dans la matrice extra-cellulaire lors de la formation osseuse ; très nombreuses, ces molécules appartiennent surtout à la superfamille du TGF $\beta$  [115] ; ces facteurs stimulent également directement ou indirectement l'angiogénèse.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux matériaux hybrides associant des matrices à base de biocéramique phosphocalcique et des cellules autologues (de moelle osseuse totale et CSMs).

## 5.3. Les cellules souches

### 5.3.1. Que sont ces cellules souches ?

Les cellules souches possèdent deux **propriétés essentielles** qui les distinguent des autres cellules :

- leur capacité à se **multiplier** indéfiniment à l'identique en culture *in vitro* pour produire de nouvelles cellules souches : capacité d'auto-renouvellement,
- et leur aptitude à se **différencier** dans un milieu environnemental adéquat en cellules différenciées, cellules ayant acquis des caractéristiques spécifiques leur permettant d'assurer une fonction particulière.

### 5.3.2. Les types de cellules souches

Il existe différents types de cellules souches :

- les **cellules souches totipotentes** : ce sont les seules cellules pouvant donner naissance à un organisme entier,
- les **cellules souches pluripotentes** : ce sont des cellules capables de générer la plupart ou tous les tissus du corps adulte, mais qui ne peuvent pas donner naissance aux tissus extra-embryonnaires tels que le placenta,
- les **cellules souches multipotentes** : ce sont des cellules capables de générer plusieurs types de cellules, elles sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique,
- et enfin, les **cellules souches unipotentes** : ce sont des cellules capables de générer un seul type de cellules différenciées, c'est ce qu'on appelle les progéniteurs intermédiaires ou précurseurs.

### 5.3.3. Origine des cellules souches

Les cellules souches existent chez l'**embryon**, chez le **fœtus** et dans son **cordon ombilical**. Il en existe également chez l'**adulte** [116].

Les cellules souches humaines sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte. Deux catégories de tissus sont distinguées : les tissus renouvelés en permanence par des cellules souches « actives » (ex : tissu sanguin, intestin et épiderme, dans une moindre mesure, os et épithélium respiratoire) et ceux contenant des cellules souches de « réserve », non actives spontanément. Sous l'influence de certains signaux, elles peuvent se différencier en cellules spécialisées avec un phénotype distinct de celui du précurseur. Ces cellules pourraient ainsi constituer des réservoirs de cellules « réparatrices », prêtes à se mobiliser et à se différencier en réponse à divers signaux. Peu d'éléments sont connus concernant cette population cellulaire endogène des adultes et son rôle précis dans la réparation et la régénération de tissus. Ceci peut être lié en particulier au manque de marqueur spécifique de ces cellules. Cependant, les récents progrès dans l'isolement et la caractérisation de ces cellules ont amené chercheurs et cliniciens à développer et à tester diverses stratégies thérapeutiques dans de multiples applications cliniques [117,118].

### 5.3.4. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs)

#### 5.3.4.1. Isolement des CSMs

Chez l'adulte, les CSMs ont été isolées à partir de nombreuses sources :

- la **moelle osseuse** adulte est un organe composé de deux systèmes principaux : le tissu propre hématopoïétique associé au stroma médullaire. La moelle osseuse (MO) est le seul organe connu dans lequel deux types de cellules souches séparées et distinctes et donc deux systèmes tissulaires dépendants, non seulement coexistent mais également coopèrent fonctionnellement : les **cellules souches mésenchymateuses** (CSMs) et les **cellules souches hématopoïétiques** (CSHs) [52]. Les CSMs issues de la MO ont été identifiées pour la première fois par Friedenstein et Pétrakova qui ont isolé des cellules ostéoprogénitrices de la moelle de rat en 1966 [119]. La MO est à ce jour l'organe le plus

étudié en tant que source de cellules pour la thérapie cellulaire. La MO possède également un type rare de cellules totipotentes, les Multipotent Adult progenitor cells (**MAPCS**), décrites comme étant les ascendants des CSHs et des CSMs présentes dans la moelle humaine [120,121]. Les CSMs sont des cellules immatures. Elles représentent 1/10 000 à 1/100 000 des cellules mononucléées totales de la moelle osseuse [122,123], elles peuvent proliférer durant 40 générations *in vitro* [124].

- Les CSMs ont également été isolées dans la **membrane synoviale** [125], le **liquide synovial** [126], les **muscles squelettiques** [127], les **tendons** [128], la **calvaria**, le **périoste** [129], l'**os trabéculaire**, l'**os alvéolaire** [130], le **cartilage** [131], les **dents de lait** [132], les **péricytes vasculaires**, le **poumon** et le **tissu adipeux** [133].

#### 5.3.4.2. Caractérisation et marqueurs de surface des CSMs

*In vitro*, la propriété d'**adhérence** au plastique n'est pas suffisante en elle-même pour permettre de purifier complètement les CSMs de la moelle osseuse [134]. Il persiste au sein de la population cellulaire d'autres précurseurs mononucléés non CSMs. Cependant, une fraction de ces cellules adhérentes correspond réellement aux CSMs. De nombreux auteurs se sont intéressés aux conditions de caractérisation de ces cellules, chez l'humain ou chez l'animal. Les CSM présentent de nombreux antigènes mais la plupart des marqueurs de surface sont peu spécifiques et peuvent être retrouvés à la surface de cellules différenciées.

Des efforts considérables ont été effectués pour identifier des **marqueurs de surface** spécifiques pour sélectionner, détecter et tester les préparations de CSMs [135]. De nombreux anticorps monoclonaux ont été évalués pour rechercher des produits réactifs pour la caractérisation et l'isolement des CSMs humaines. **Stro-1** a été identifié comme un anticorps marquant les cellules stromales progénitrices non hématopoïétiques de la MO : il est actuellement le marqueur le plus utilisé pour caractériser et isoler les CSMs [136,137].

### 5.3.4.3. Différenciation et fonctionnalité des CSMs

De nombreuses études ont été menées *in vitro* afin d'évaluer les potentiels de différenciation des CSMs, les conditions de culture et les stimuli à l'origine des voies de différenciation de ces cellules.

La différenciation des CSMs vers des lignées cellulaires de type **ostéoblastique**, **chondrocytaire**, **adipocytaire** a été décrite et caractérisée par de nombreuses équipes [116-118,135,136].

Les CSMs sont des cellules à fort **potentiel ostéogénique** capables de se différencier vers un phénotype ostéoblastique [138,139]. L'activation ostéogénique *in vitro* nécessite la présence d'un milieu de culture ostéogénique approprié comportant du  $\beta$ -glycérophosphate, de l'acide ascorbique 2-phosphate, de la vitamine D et du sérum de veau fœtal. Les cellules acquièrent un phénotype ostéoblastique lorsqu'elles sont cultivées en présence de ces suppléments et lors d'une culture en monocouche. Il semblerait que les CSMs isolées à partir du tissu adipeux humain présentent également un potentiel ostéogénique [140,141] mais inférieur à celui des CSMs isolées à partir de la MO [142] ; pour d'autres équipes, ce potentiel semble être identique [143]. Quoi qu'il en soit, le tissu adipeux pourrait constituer une excellente source de CSMs du fait de la quantité présente dans l'organisme humain et de la disponibilité de déchets opératoires engendrés par la chirurgie. De plus, leur taux ne semble pas diminuer avec l'âge de l'individu [144], contrairement aux CSMs issues de la MO [145,146].

Les CSMs ont donc été qualifiées pendant longtemps de cellules souches multipotentes. Mais, certaines observations ont montré que la **plasticité phénotypique** des populations de CSMs était plus élevée que ce qui était initialement supposé. En effet, de nombreux travaux ont montré qu'elles pouvaient se différencier vers des lignées cellulaires de type **stromal**, **hépatocytaire**, **myoblastique**, **tendineux**, **rénal** et **neuronal** [116-118,135,136].

Enfin, le rôle potentiel des CSMs dans la formation des vaisseaux sanguins a également été évalué [147-149]. L'utilisation de cellules souches dérivées de la MO a permis l'augmentation de la néovascularigénèse associée à la régénération tissulaire après un infarctus du myocarde [150]. D'autres auteurs ont montré que ces cellules se différenciaient en un phénotype endothélial et qu'elles augmentaient la vascularisation. De récentes études ont montré que les CSMs pouvaient se différencier en **cardiomyocytes** [151], **cellules endothéliales** et **cellules musculaires lisses** après une injection directe dans un cœur adulte.

## 5.4. Les différentes études sur les associations

### 5.4.1. Les associations possibles

Les associations possibles présentées ci-après concernent les matériaux hybrides obtenus en associant les matrices à base de biocéramiques phosphocalciques et les cellules issues de la MO totale (MOT). Quatre possibilités sont envisageables concernant l'ensemencement de ces cellules sur la matrice :

- l'association extemporanée d'un prélèvement de MOT autologue avec la matrice suivie d'une implantation immédiate de ce nouveau matériau hybride,
- le prélèvement de MOT suivi de sa culture *in vitro* au contact de la matrice avant implantation,
- le prélèvement de MOT suivi de sa culture *in vitro* sur plaque pour sélectionner et amplifier les CSMs, puis l'association de ces CSMs à la biocéramique suivie d'une implantation immédiate,
- le prélèvement de MOT suivi de sa culture *in vitro* pour sélectionner et amplifier les CSMs, puis l'association de ces CSMs à la biocéramique cultivés *in vitro* avant l'implantation de ce nouveau matériau hybride.

Chacune des techniques présente des avantages et des inconvénients. La première technique a surtout l'avantage d'être réalisable en peropératoire (absence de culture) et de ne pas nécessiter un équipement important ; par ailleurs, la possibilité d'une autogreffe permet l'absence de rejet et de transmission de maladies virales et/ou bactériennes ; néanmoins, l'inconvénient de cette technique est la quantité limitée de cellules ostéocompétentes

présentes dans la greffe (environ 1 CSM pour 10 000 à 100 000 cellules nucléées) [122,123]. Les trois autres techniques présentent l'inconvénient majeur de ne pas pouvoir être réalisées en peropératoire (nécessité d'une culture cellulaire *in vitro*), excepté si elles utilisent des cellules provenant d'une banque de tissus : dans ce cas, le patient présente un risque de rejet de greffe, d'incompatibilité ou de transmission de maladies virales et/ou bactériennes ; néanmoins, la culture des cellules permet leur multiplication et ainsi l'obtention dans la greffe d'une quantité plus importante de cellules ostéocompétentes.

La MO peut être utilisée dans ces quatre approches. La culture des cellules peut être réalisée soit pour la multiplication des cellules soit pour orienter leur différenciation. L'utilisation de la graisse nécessite dans tous les cas une étape *in vitro* pour isoler les cellules ; l'avantage majeur de la graisse est représentée par sa quantité disponible très importante.

## **5.4.2. Les associations pour une néoformation osseuse sans irradiation**

### **5.4.2.1. Etudes *in vitro***

Les propriétés intrinsèques des biocéramiques peuvent être potentialisées par l'adjonction de différentes molécules ou cellules à leur surface. Les CSMs associées à la surface d'une biocéramique sont capables d'adhérer, de proliférer, de se différencier en ostéoblastes et de coloniser l'ensemble de l'implant *in vitro*. L'utilisation d'une céramique transparente a permis de suivre cette cascade de différenciation ostéoblastique [152].

Toquet et Coll. ont montré que les CSMs issues de MO humaine cultivées sur des céramiques à base de BCP macroporeux conservaient leur phénotype ostéoblastique et que ces cellules étaient capables de former une nouvelle matrice osseuse *in vitro* [153].

Hattori et Coll. ont montré la capacité similaire de différenciation en ostéoblastes de CSMs issues du tissu adipeux humain et issues de moelle osseuse associées à un biomatériau constitué de  $\beta$ TCP *in vitro* [143].



#### 5.4.2.2. Etudes *in vivo*

- Etudes **chez l'animal**

Des études précliniques ont montré l'efficacité de l'association de MO totale ou de CSMs aux biocéramiques dans des sites sains chez divers modèles animaux [154-159]. Ces études sont reportées dans le Tableau N°III. Les cellules utilisées peuvent avoir pour origine la MO totale ou bien une culture de CSMs issues de MO ou d'une autre origine comme la graisse. Les études précliniques ont montré un fort potentiel ostéogénique des CSMs dans la régénération osseuse. L'association de cellules souches à une matrice a pour objectif d'accélérer le processus de régénération osseuse en apportant directement sur le lieu d'implantation des cellules ostéoprogénitrices. L'orientation des cellules vers un phénotype ostéoblastique avant implantation permettrait d'accélérer les processus de régénération osseuse. Cependant, une grande variabilité des résultats liés à cette culture cellulaire est observée. Les biocéramiques phosphocalciques à base d'HA, de  $\beta$ -TCP et de BCP sont les plus utilisées comme matrices cellulaires. Les cellules présentes à la surface de ces biomatériaux prolifèrent et se différencient également *in vivo*. Ces nouvelles thérapeutiques pourraient être une bonne alternative à l'autogreffe osseuse.

- Etudes **chez l'homme**

Les premières applications cliniques chez l'homme ont été réalisées chez 3 enfants atteints d'ostéogenèse imparfaite par l'équipe d'Horwitz [160]. L'ostéogenèse imparfaite est caractérisée par une ostéopénie généralisée menant à des déformations osseuses, un retard de croissance et de multiples fractures. Une greffe allogénique de CSMs issues de MO a été réalisée chez ces 3 patients ; une amélioration de la croissance et de la densification osseuse ainsi qu'une réduction du nombre de fractures ont été observées chez les 3 enfants.

D'autres applications cliniques ont également été réalisées avec le même succès. Quarto et Coll. ont montré l'efficacité de l'implantation *in vivo* d'ostéoprogéniteurs autologues isolés de la MO des patients et cultivés *ex vivo* sur un biomatériau à base d'HA macroporeuse pour traiter des patients présentant d'importants défauts osseux [161].

### **5.4.3. Les associations pour une néoformation osseuse avec irradiation**

Ainsi l'intérêt de l'association *in vivo* de biocéramiques et de moelle osseuse ou de CSMs a été démontré à plusieurs reprises, en site osseux ou ectopique. L'implantation de ces matériaux issus de l'ingénierie tissulaire osseuse donne des résultats précliniques très encourageants. Cependant une telle association en territoire irradié n'a fait l'objet que de deux publications à ce jour, issues de notre laboratoire [19,20].

Les résultats prometteurs issus de ces travaux nous ont encouragé à poursuivre ces recherches.

<b>Indication</b>	<b>Modèle animal voie de délivrance</b>	<b>Source des CSMs</b>	<b>Résultats</b>	<b>Référence</b>
Défaut osseux segmentaire = Défaut taille critique fémur	Rat athymique Support en céramique	CSMs humaines de MO	Augmentation de la formation osseuse Amélioration biomécanique	Bruder, Kurth et Coll., 1998 [156]
Défaut osseux segmentaire = Défaut taille critique fémur	Chien Support en céramique = cylindre céramique poreuse (HA et $\beta$ TCP)	CSMs autologues de MO 30.10 <sup>6</sup> CSMs par implant CSMs non différenciées	Augmentation de la formation osseuse	Bruder, Kraus et Coll., 1998 [155]
Défaut osseux segmentaire = Défaut taille critique fémur	Chien Support en céramique = cylindre céramique poreuse (HA et $\beta$ TCP)	CSMs allogéniques de MO 37,5.10 <sup>6</sup> CSMs par implant CSMs non différenciées	Augmentation de la formation osseuse	Arinzeh et Coll., 2003 [154]
Défaut osseux = Défaut taille critique condyle fémoral	Lapin Support en céramique = granules de TricOs (HA et $\beta$ TCP) et fibrine	MO totale autologue	Pas d'augmentation de la formation osseuse	Le Nihouannen et Coll., 2006 [157]
Défaut osseux = Défaut taille critique bilatéral crânien fronto-pariétal	Chien Support en céramique = particule de HA et TCP	CSMs autologues de MO 50 à 70.10 <sup>6</sup> CSMs /gramme de particule CSMs différenciées	Augmentation de la formation osseuse	Mankani et Coll., 2006 [158]
Défaut osseux segmentaire = Défaut taille critique fémur	Rat Support en soie	CSMs humaines de MO 1.10 <sup>6</sup> CSMs par implant CSMs différenciées ou non	Augmentation de la formation osseuse Meilleure avec CSMs différenciées	Meinel et Coll., 2006 [159]

**Tableau N°III : application thérapeutique de l'utilisation de moelle osseuse et de CSMs pour la reconstruction osseuse dans divers modèles animaux**

## 6. PROBLEMATIQUE ET PLAN DE THESE

---

La première partie de cette étude présente le développement d'un nouveau modèle animal d'ostéoradionécrose capable de servir de base à l'étude de thérapeutiques reposant sur l'ingénierie tissulaire osseuse. Pour obtenir ce modèle expérimental, des irradiations à doses supra-thérapeutiques ont été menées sur une souche de rats consanguins et des pertes de substances osseuses créées. Cette première partie présente également les manifestations radiologiques et anatomopathologiques des effets de très fortes doses d'irradiation sur l'histopathologie et la cicatrisation osseuses.

La deuxième partie de cette étude est consacrée à l'évaluation de la cicatrisation osseuse en terrain irradié à des doses thérapeutiques. Le même modèle animal de perte de substance osseuse au sein de séquelles tissulaires d'irradiation osseuse a été utilisé. Une irradiation focalisée en unidose a été effectuée, puis des pertes de substances osseuses ont été créées afin d'évaluer le bénéfice apporté par l'implantation d'un biomatériau injectable (IBS) associé à de la moelle osseuse totale. L'utilisation d'une souche de rats consanguins a permis une autogreffe médullaire interindividuelle.

L'objectif de la troisième partie a été de comparer la cicatrisation osseuse obtenue lors de l'association de moelle osseuse totale ou de cellules souches mésenchymateuses à un biomatériau non injectable (granules de BCP) sur le même modèle animal irradié à des doses thérapeutiques. Cette étude a également confronté deux sources distinctes de CSMs : les CSMs issues de la moelle osseuse de rats et les CSMs issues du tissu adipeux de rats.



**II. DEUXIEME PARTIE :**

**SEQUELLES ANATOMO-PATHOLOGIQUES ET  
RADIOLOGIQUES DE L'OS IRRADIE À DOSE  
SUPRA-THERAPEUTIQUE**

# 1. CONTEXTE D'ETUDE

---

Les carcinomes épidermoïdes des Voies Aéro-Digestives Supérieures constituent un problème de santé publique majeur. La majorité des patients ayant « bénéficié » d'une chirurgie d'exérèse carcinologique liée à une tumeur cervico-faciale reçoivent une radiothérapie post-opératoire [28,162]. Les radiations ionisantes jouent un rôle clef dans le traitement curatif de nombreuses néoplasies. Lorsqu'une tumeur maligne est irradiée, les tissus sains à proximité de cette tumeur le sont également et les cellules « normales », non tumorales, peuvent présenter une mort cellulaire immédiate, retardée ou des séquelles. Malgré les récents progrès techniques en radiothérapie (hyper fractionnement, radiothérapie par modulation d'intensité) [163], les radiations ionisantes génèrent toujours des effets secondaires majeurs, aigus ou chroniques, réversibles ou irréversibles au niveau moléculaire, cellulaire et finalement tissulaire. Des complications dramatiques peuvent survenir à plus ou moins long terme ; il s'agit le plus souvent du développement d'ostéoradionécroses (ORN) [164,165] ou plus rarement de l'induction de tumeurs secondaires, telles que les sarcomes [43].

La localisation la plus fréquente de l'ORN est la mandibule [72,164-167] ; cependant, chaque os irradié peut être atteint (maxillaire, pelvis, clavicule, tête fémorale, ...) [168]. En fonction des séries et des sites anatomiques étudiés, l'ORN présente une incidence variant de 1 à 37% [41]. Une ORN progresse plus ou moins lentement, ne cicatrise pas spontanément, et peut évoluer vers une fracture pathologique. Les ORN limitées de la mandibule peuvent être traitées par antibiothérapie, séquestromie et/ou oxygène hyperbare selon les auteurs [72,164,165]. Les patients présentant une ORN étendue nécessitent une prise en charge plus radicale avec un traitement chirurgical pouvant être interrupteur (hémi-mandibulectomie interruptrice) [72,164,165]. Ces thérapeutiques créent des défauts esthétiques et fonctionnels majeurs au niveau cervico-facial, altérant considérablement la qualité de vie des patients. Les hypothèses concernant le déclenchement d'une ORN mandibulaire sont relativement bien documentées chez l'homme (extractions dentaires pré ou post-radiques, mauvaise hygiène dentaire, intoxication alcoolo-tabagique, dose d'irradiation, localisation de la tumeur) [72,164-167]. Cependant, peu d'études sont reportées concernant les caractéristiques

histo-pathologiques d'un os irradié, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal. De plus, peu d'études expérimentales portent sur la reconstruction osseuse en territoire préalablement irradié. Dans ces conditions, pouvoir disposer d'un modèle animal de séquelles d'irradiation serait très utile pour tester différents traitements de réparation et de reconstruction d'une ORN.

Ainsi, les objectifs de cette étude ont été d'évaluer radiologiquement et anatomopathologiquement les effets de très fortes doses d'irradiation sur l'histopathologie et la cicatrisation osseuses et de mettre au point un nouveau modèle animal d'ORN capable de servir de base à l'étude de thérapeutiques d'ingénierie tissulaire osseuse.

Une étude de faisabilité sur 3 rates a été réalisée dans un premier temps afin de mettre au point les différentes séquences expérimentales ; l'étude principale a été conduite dans un second temps.



## 2. MATERIEL ET METHODES

---

### 2.1. Etude de faisabilité

#### 2.1.1. Animaux

Trois rates consanguines de souche Lewis A1-haplo type RT1<sup>a</sup> (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France) ont été utilisées. Les animaux, âgés de 8 semaines et d'un poids  $\geq 225$  grammes, ont été acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. L'ensemble de l'expérimentation animale a été mené au sein de l'Unité Thérapeutique Expérimentale de l'Institut Fédératif de Recherche 26 à la Faculté de Médecine de Nantes (UTE, IFR 26, Nantes, France).

Les rates ont été placées dans des cages standard dans un local à température constante de 21°C et soumis à des cycles de 12/12h d'éclairage-obscurité. Les animaux ont été alimentés avec une nourriture de laboratoire standard et ont reçu de l'eau *ad libitum*.

La stabulation des rates et l'expérimentation ont été conduites dans le respect de la directive européenne réglementant la conduite des expérimentations animales (directive européenne n°86/609/CEE).

#### 2.1.2. Expérimentation

##### 2.1.2.1. Radiographies

###### 2.1.2.1.1. Généralités

Les radiographies argentiques ont été réalisées sur des clichés rétro-alvéolaires (film ultra-speed, Kodak, sensibilité D, format : 31 X 41 mm, taille 2, DF-58) à partir d'un générateur long-cône de rayons X (Secondent Philips, 5 ampères, 50 Hertz).

###### 2.1.2.1.2. Réalisation pratique

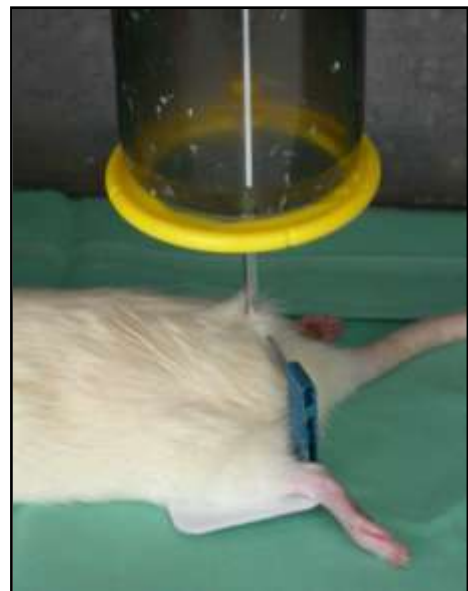
L'inconvénient de cette race est sa fragilité vis-à-vis de l'anesthésie (25% de décès post-anesthésiques dans une étude antérieure réalisée dans le laboratoire [169] ; cette fragilité nous a amenés à modifier le protocole anesthésique initialement prévu selon les conseils de

l'équipe de C. Cuturi de l'Unité INSERM U437 à Nantes [170]. Les animaux ont été endormis à l'UTE selon le protocole anesthésique suivant : induction à l'isoflurane à 3% (Forène<sup>®</sup>, laboratoire Abbott, Rungis, France), pesée des animaux, injection en intramusculaire de 0,075ml/100gr de mélange de 1/5 de Xylazine (Rompun<sup>®</sup> 2%, laboratoire Bayer Pharma, Puteaux, France) et de 4/5 de Kétamine (Imalgène<sup>®</sup> 500, laboratoire Merial, Lyon, France).

Les rates ont été placées sur le ventre, les membres en extension. Deux radiographies ont été réalisées pour chacune des rates (côté droit et côté gauche). Le film rétro-alvéolaire, perpendiculaire à l'émetteur de rayons X, était solidaire du générateur de rayons X grâce à un bras angulateur provenant du système de RINN<sup>®</sup> (Figures N°2). Cet angulateur était fixé sur le générateur et relié au support de la radiographie. Le temps d'exposition déterminé a été de 0,64 secondes.

Les radiographies rétro-alvéolaires ont été réalisées :

- à J0 : début étude (après acclimatation et avant l'irradiation),
- à J21 : 7 jours avant la réalisation du défaut osseux (14 jours après l'irradiation), puis tous les 14 jours jusqu'à l'euthanasie de l'animal.



**Figures N°2 : radiographie rétro-alvéolaire des rates, générateur long-cône, angulateur et système de RINN<sup>®</sup>**

## **2.1.2.2. Procédure d'irradiation**

### 2.1.2.2.1. Généralités

L'irradiation externe des animaux a été réalisée au Centre Régional de la Ligue Contre le Cancer (CRLCC René Gauducheau, Nantes, France). L'irradiateur utilisé était un Théatron 780 (Atomic Energy, Canada) émettant des photons issus du Cobalt 60 et possédant une énergie de 5 MeV. Cet irradiateur était un dispositif réformé pour la pratique de la radiothérapie externe humaine et utilisé dorénavant dans le cadre d'une convention établie entre le CRLCC et l'IFR 26 de l'Université de Nantes pour les activités de recherche.

### 2.1.2.2.2. Calcul de dose

Le calcul du temps d'exposition nécessaire à la dose d'irradiation souhaitée est un paramètre dépendant à la fois de la distance source-objet (l'intensité du rayonnement décroît proportionnellement à l'inverse du carré de cette distance) et de l'âge de la source de Cobalt 60 au moment de l'irradiation (le débit est lié à la demie-vie de la source). Ce calcul a été effectué par le service de biophysique du CRLCC en tenant ainsi compte de la distance source-objet et de l'ancienneté de la source.

### 2.1.2.2.3. Réalisation pratique

L'irradiation externe a concerné les 3 animaux. Elle a été réalisée à J7 sous anesthésie générale.

Les rates ont été endormies à l'UTE selon le même protocole anesthésique que pour les radiographies rétro-alvéolaires, puis transportées dans des cages à filtre au CRLCC. Avant la phase de positionnement des animaux sous l'irradiateur, une nouvelle injection intra-musculaire de 0,075ml/100gr de Xylazine (1/5) et Kétamine (4/5) a été effectuée (soit environ 45 minutes après la première).

Les rates ont été placées sous le champ d'irradiation. Un LASER de point central, indiquant la position du tube émetteur de Cobalt par exposition lumineuse du contour du faisceau incident, a permis de visualiser et de délimiter le champ d'irradiation. Le maintien

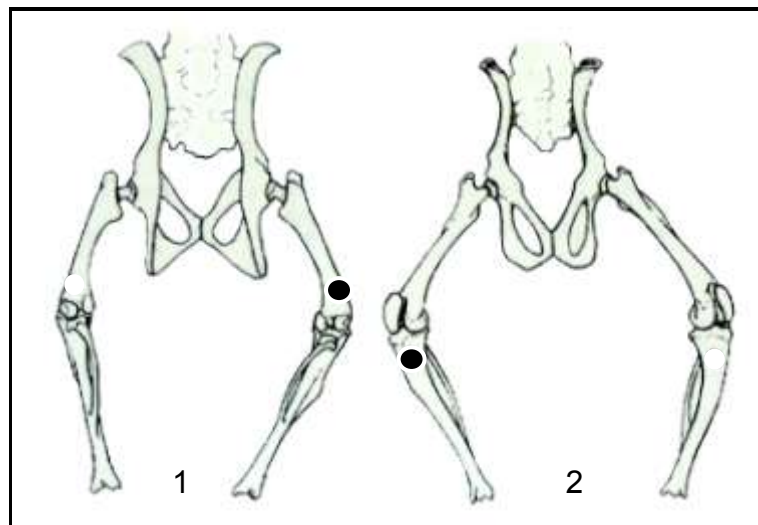
des rates dans les limites de ce champ a été assuré grâce à un système de contention des membres inférieurs, préalablement moulé dans un support en résine époxy et fabriqué sur mesure pour les irradiations de rats [169]. Le champ d'irradiation a été limité aux membres inférieurs épargnant le pelvis des rates. La source de Cobalt 60 a été placée à 80 cm des animaux. La dose d'irradiation souhaitée était de 30 Gy pour les trois rates. Elle a été délivrée selon un fractionnement d'une unidose de 30 Gy et l'exposition nécessaire pour l'obtention de cette dose a été calculée à 37 minutes le jour de l'irradiation.

### **2.1.2.3. Création des défauts osseux**

Trois semaines après la procédure d'irradiation (J28), les 3 animaux ont été opérés selon le protocole opératoire suivant (Figures N°3) :

- l'induction anesthésique a été réalisée en chambre close par inhalation d'isofluorane (Forène<sup>®</sup>, laboratoire Abbott, Rungis, France) à 3%, puis entretenue par la poursuite de l'inhalation au masque à une concentration de 1,5 à 2%,
- rasage des membres inférieurs du côté opéré (gauche),
- désinfection cutanée à la polyvidone iodée (Bétadine<sup>®</sup>, Astra Médica, Mérignac, France),
- abord chirurgical en condition d'asepsie rigoureuse de la face latérale de la métaphyse fémorale distale et de la face médiale de la métaphyse proximale tibiale, de part et d'autre de l'interligne articulaire fémoro-tibiale, après luxation patellaire,
- incision périostée de la face latérale de la métaphyse distale du fémur gauche et de la face médiale de la métaphyse proximale du tibia gauche,
- confection du défaut osseux calibré (3 mm de diamètre) à l'aide d'une pièce à main chirurgicale et d'une fraise boule multiplans refroidie par du sérum physiologique stérile : la trépanation a été menée jusqu'à la corticale osseuse opposée,
- hémostase par compression à l'aide de compresses stériles,
- suture hermétique en 2 plans, musculaire et cutané, au fil résorbable Vicryl<sup>®</sup> 4/0 (Ethicon, France).

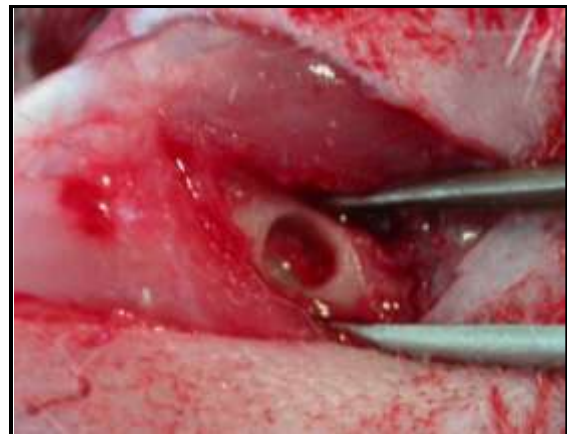
Les tibias et fémurs droits n'ont pas été opérés.



A



B



C

**Figures N°3 : création des défauts osseux**

**A – Schéma des défauts osseux épiphysaires fémoral distal et tibial proximal (●)**

**1 - Face dorsale du squelette du rat**

**2 – Face ventrale du squelette du rat**

**Pertes de substances osseuses calibrées en sites tibial (B) et fémoral (C)**

#### **2.1.2.4. Stabulation**

Les animaux opérés ont été placés dans une cage individuelle à une température constante de 21°C et soumis à des cycles de 12/12h d'éclairage-obscurité. Il n'a pas été noté de souffrance chez ces animaux qui ont fait l'objet de soins quotidiens à l'UTE jusqu'à leur sacrifice.

#### **2.1.2.5. Euthanasie et prélèvement des échantillons**

Les 3 rates ont été euthanasiées par injection létale intra-péritonéale de barbiturique rapide (200 mg de Thiopental sodique, Nesdonal<sup>®</sup>, Rhône-Mérieux, Lyon, France) à un délai de 6 mois après l'irradiation (24 semaines).

Après désinfection cutanée à la polyvidone iodée (Bétadine<sup>®</sup>, Astra Médica, Mérignac, France), le prélèvement des fémurs droits et gauches et des tibias droits et gauches a été effectué à l'aide d'une instrumentation stérile. Les pièces osseuses ont été directement placées dans un milieu fixateur composé de para formaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate (PBS, Seromed, Berlin, Allemagne) pendant 72 heures.

## **2.2. Etude principale**

### **2.2.1. Animaux**

Pour l'étude principale, quatorze rates consanguines de souche Lewis A1-haplotype RT1<sup>a</sup> (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France) ont été utilisées. Pour cette étude, le type d'animaux, l'acclimatation, l'alimentation et la stabulation des animaux étaient les mêmes que dans l'étude de faisabilité.

L'expérimentation a été conduite dans le respect de la directive européenne réglementant la conduite des expérimentations animales (directive européenne n°86/609/CEE).

### **2.2.2. Expérimentation**

#### **2.2.2.1. Séparation des animaux**

Les animaux ont été séparés en trois groupes :

- Groupe 1 : 6 rates Lewis 1A irradiées à 30 Gy,
- Groupe 2 : 6 rates Lewis 1A irradiées à 45 Gy,
- Groupe 3 : 2 rates Lewis 1A non irradiées (témoins).

#### **2.2.2.2. Radiographies**

Les radiographies argentiques ont été réalisées de la même façon que dans l'étude de faisabilité, sur des clichés rétro-alvéolaires sous anesthésie générale.

#### **2.2.2.3. Procédure d'irradiation**

L'irradiation externe des animaux a été réalisée selon le même protocole que pour l'étude de faisabilité (Figure N°4A). L'irradiation a concerné les 12 animaux des groupes N°1 et N°2 (Figures N°4B et N°4C). Les animaux non irradiés n'ont pas été anesthésiés.

La dose d'irradiation souhaitée était de 30 Gy pour le groupe N°1 et de 45 Gy pour le groupe N°2. Elle a été délivrée selon un fractionnement d'une unidose de 30 Gy pour le groupe N°1 et de 45 Gy pour le groupe N°2.

Le calcul des temps d'exposition a également été effectué par le service de biophysique du CRLCC en tenant compte de la distance source-objet et de l'ancienneté de la source.

Initialement, la source de Cobalt 60 étant placée à 80 cm des animaux, l'exposition nécessaire pour l'obtention de ces doses était calculée respectivement à 39 minutes et 56 minutes le jour de l'irradiation.

Afin de diminuer le temps d'anesthésie des animaux, la source de Cobalt 60 a été rapprochée des animaux. Elle a ainsi été placée à 55 cm des animaux. L'exposition nécessaire pour l'obtention de 30 Gy et de 45 Gy a ainsi été calculée respectivement à 19 minutes, 28 minutes le jour de l'irradiation.

#### **2.2.2.4. Création des défauts osseux**

A J28, les animaux des groupes N°1 et N°2 ont été opérés selon le même protocole que dans l'étude de faisabilité. La confection des défauts osseux a été réalisée sous anesthésie générale au niveau des tibias et fémurs gauches. Les tibias et fémurs droits n'ont pas été opérés (répartition exposée dans le Tableau N°V).

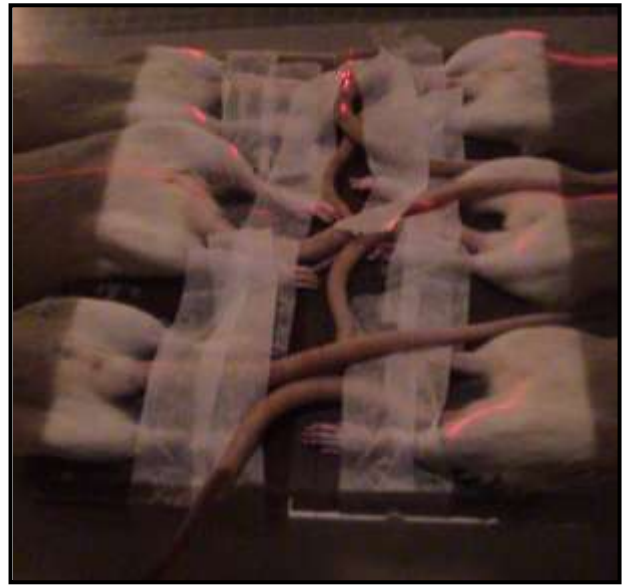
#### **2.2.2.5. Stabulation**

La stabulation des animaux a été identique à celle de l'étude de faisabilité.





**A**



**B**



**C**

**Figures N°4 : irradiation des rates**

**A – Source de Cobalt 60 : Irradiateur Théatron 780 (Atomic Energy, Canada),  
CRLCC, Nantes, France**

**B – Mise en place des animaux et limites du champ d’irradiation**

**C – Contrôle externe**

### 2.2.2.6. Euthanasie et prélèvement des échantillons

Les rates des trois groupes ont été euthanasiées par injection létale intra-péritonéale de barbiturique rapide (200 mg de Thiopental sodique, Nesdonal<sup>®</sup>, Rhône-Mérieux, Lyon, France).

Les délais d'euthanasie choisis ont été de :

- 0 mois pour une rate du groupe N°3,
- 3 mois après l'irradiation pour 3 rates des groupes N°1 et N°2,
- 4 mois ½ après l'irradiation pour 3 rates des groupes N°1 et N°2 et pour 1 rate du groupe N°3.

Le prélèvement et la fixation des pièces osseuses ont également été réalisés de la même façon que dans l'étude de faisabilité.

La répartition des animaux, doses d'irradiation, défauts osseux et délais d'euthanasie sont reportés dans le Tableau N°IV.

### 2.2.2.7. Synthèse

Le déroulement des séquences irradiation – création de défaut osseux et explantation est résumé dans la Figure N°5.

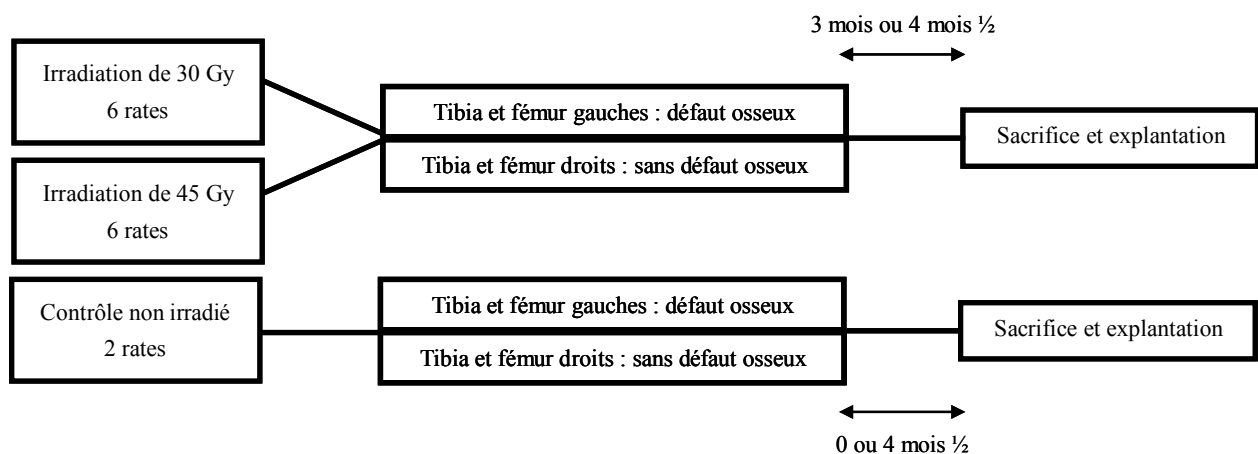


Figure N°5 : résumé du déroulement chronologique de l'expérimentation

Groupe N°	Rate N°	Dose d'irradiation (Gy)	Défaut osseux				Euthanasie (semaines)
			Fémur droit	Tibia droit	Fémur gauche	Tibia gauche	
1	1	30	-	-	+	+	12 s
	2	30	-	-	+	+	12 s
	3	30	-	-	+	+	12 s
	4	30	-	-	+	+	18 s
	5	30	-	-	+	+	18 s
	6	30	-	-	+	+	18 s
2	7	45	-	-	+	+	12 s
	8	45	-	-	+	+	12 s
	9	45	-	-	+	+	12 s
	10	45	-	-	+	+	18 s
	11	45	-	-	+	+	18 s
	12	45	-	-	+	+	18 s
3	1	Non irradiée	-	-	-	-	0 s
	1	Non irradiée	-	-	+	+	18 s

**Tableau N°IV : répartition des défauts osseux et doses d'irradiation**



**Animaux décédés (n = 2)**

### **2.2.3. Etude des explants**

#### **2.2.3.1. Observations radiologiques**

Le développement des films radiographiques a été effectué manuellement en chambre noire. Il a été réalisé selon un protocole toujours identique dans des bains de révélateur et de fixateur thermostatés, renouvelés à chaque développement. Les temps préconisés par le fabricant ont été respectés : révélateur 2 minutes, rinçage à l'eau 1 minute, fixateur 2 minutes et rinçage à l'eau 2 minutes (Kodak, France).

Les radiographies ont été examinées directement sur négatoscope par trans-illumination (ella, MED'X).

#### **2.2.3.2. Observations histologiques**

##### **2.2.3.2.1. Inclusion à la paraffine**

Après fixation, les prélèvements ont été décalcifiés dans un bain d'acide nitrique à 10% durant 48 heures.

Les échantillons décalcifiés ont ensuite été déshydratés dans des bains d'éthanol à 100% (5 bains d'une heure chacun), puis avec du toluène (3 bains d'une heure chacun). Les prélèvements ont été inclus en paraffine à l'aide d'une Shandon Patchcentre (Shandon scientific, England).

##### **2.2.3.2.2. Réalisation des coupes**

Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à tissus mous (Leica RM 2155, Leica Instrument GmbH, Nussloch, Germany).

Les coupes ont été effectuées dans le sens sagittal des échantillons.

#### **2.2.3.2.3. Coloration et étude histologique**

Les coupes obtenues ont été colorées en Hématoxyline Phloxine Safran (HPS). La technique de coloration est décrite en Annexe N°1.

Les coupes ont ensuite été montées entre lame et lamelle à l'aide d'un kit de Montage Protex (Consul Mount, Shandon, Runcorn, UK) sur un automate (Thermo Electron Corporation, Shandon, Astmoor, England) pour être étudiées en microscopie optique. Les sections histologiques ainsi que la cicatrisation des os ont été analysées.

L'analyse histologique a été effectuée avec un médecin spécialiste de l'histologie osseuse du service d'anatomie pathologique du CHU de Nantes (Dr Anne Moreau).

## **3. RESULTATS**

---

### **3.1. Etude de faisabilité**

#### **3.1.1. Procédure d'anesthésie**

Cette race présente l'inconvénient de sa fragilité. Les modalités d'anesthésie générale avaient été modifiées suite aux décès post-anesthésiques d'une précédente étude réalisée dans notre laboratoire (25% de décès post-anesthésiques [169], ce taux étant supérieur au taux habituellement déploré avec des animaux non consanguins type Wistar (environ 10%)).

Pourtant, il y a eu 1 décès lié à un surdosage anesthésique pendant l'irradiation.

#### **3.1.2. Radiographies**

Il n'y a pas eu de problème lié à la réalisation de radiographies rétro-alvéolaires.

La procédure de radiographie et le développement des films ont permis une standardisation de ces clichés radiologiques. La qualité du développement était bonne.

Le bras angulateur du système de RINN<sup>®</sup> a permis :

- un repositionnement précis et reproductible (dans le temps et en fonction des animaux),
- l'obtention d'une distance, film-source, objet-source, film-objet constante,
- l'obtention d'une orthogonalité constante et donc l'absence de déformation,
- un agrandissement de 1.

#### **3.1.3. Procédure d'irradiation**

Il n'y a pas eu de problème pendant la réalisation de l'irradiation, en dehors du problème anesthésique.

Il n'y a pas eu d'incidents liés aux radiations ionisantes, en dehors des effets habituels. Une radiodermite de grade 1 a été observée. Aucun traitement spécifique n'a été nécessaire pour la prise en charge des effets secondaires de cette irradiation.

Une dépilation a également été observée. Cette dépilation a débuté dès 15 jours après la radiothérapie et était toujours présente à 6 mois de l'irradiation.

#### **3.1.4. Création des défauts osseux**

Dans l'étude de faisabilité, il n'y a pas eu de problème pendant la création des défauts osseux. Aucune infection n'a été constatée après la chirurgie des animaux.

### **3.2. Etude principale**

#### **3.2.1. Procédure d'anesthésie**

Il y a eu à déplorer 2 décès liés à un surdosage anesthésique lors de l'irradiation des rates, soit pendant l'irradiation (rate N°3), soit en post-radique immédiat (rate N°9). Ces décès sont survenus malgré la diminution du temps d'exposition aux radiations ionisantes.

#### **3.2.2. Radiographies**

Dans l'étude principale, il n'y a pas eu de problème lié à la réalisation de radiographies rétro-alvéolaires.

#### **3.2.3. Procédure d'irradiation**

La procédure d'irradiation externe s'est déroulée sans difficulté particulière en dehors des problèmes liés à l'anesthésie.

Il n'y a pas eu d'incidents liés aux radiations ionisantes, en dehors des effets habituels (type radiodermite cutanée régressive). Pour les rates irradiées à 30 Gy, la radiodermite était

de grade 1 ; pour les rates irradiées à 45 Gy, la radiodermite était de grade 2. Aucun traitement spécifique n'a été nécessaire pour la prise en charge des effets secondaires de cette irradiation.

Une dépilation a été observée aux deux doses d'irradiation. Cette dépilation a débuté dès 15 jours après la radiothérapie, s'est généralisée à l'ensemble des rates à partir de 30 jours ; elle devenait plus prononcée à partir de 45 jours. La dépilation était toujours présente à 6 mois de l'irradiation pour les rates irradiées à 30 Gy, et à 4 mois ½ de l'irradiation pour les rates irradiées à 45 Gy.

#### **3.2.4. Création des défauts osseux**

Il n'y a pas eu à déplorer de décès post-chirurgical dans cette expérimentation. Aucune infection n'a été constatée après la chirurgie des animaux. Une fracture a été observée chez une des rates irradiées à 45 Gy, celle-ci a donc été euthanasiée à 2 mois ½ de la radiothérapie au lieu des 3 mois prévus initialement.

### **3.3. Synthèse**

Les pièces anatomiques de l'étude de faisabilité ont été analysées avec celles de l'étude principale (répartition exposée dans le Tableau N°V).



Type de rate <sup>o</sup>	Nombre de rates (n =)	Dose d'irradiation (Gy)	Défaut osseux				Euthanasie (semaines)
			Fémur droit	Tibia droit	Fémur gauche	Tibia gauche	
Lewis	2	30	-	-	+	+	12 s
Lewis	3	30	-	-	+	+	18 s
Lewis	2	30	-	-	+	+	24 s
Lewis	2	45	-	-	+	+	12 s
Lewis	3	45	-	-	+	+	18 s
Lewis	1	Non irradiée	-	-	-	-	0 s
Lewis	1	Non irradiée	-	-	+	+	24 s

**Tableau N°V : répartition finale des défauts osseux et doses d'irradiation**

### **3.4. Observations radiologiques**

#### **3.4.1. Résultats**

« L'os radiologiquement normal » était un os ne présentant pas de modifications radiologiques de la densité de la trabéculatation osseuse. « L'os radiologiquement anormal » était un os présentant des modifications radiologiques de la densité de la trabéculatation osseuse, très légères ou plus importantes.

Le défaut osseux « non visible » correspondait à un défaut osseux cicatrisé radiologiquement « sans cicatrice » ou « trace » (sans modification de la densité radiologique). Le défaut osseux « visible » correspondait à un défaut osseux soit cicatrisé mais avec des « traces » soit non cicatrisé ; il était caractérisé par une modification de la densité radiologique plus ou moins importante et par la présence ou non d'un liseré d'ostéocondensation.

- **Observations radiologiques sans irradiation**

Les rates non irradiées présentaient un os normal radiologiquement, que ce soit avec ou sans défaut osseux (Figure N°6A). Une cicatrisation normale des défauts osseux était observée sans modification de la densité trabéculaire, ni liseré d'ostéocondensation.

- **Observations radiologiques après une irradiation de 30 Gy**

Les résultats des examens radiologiques après une irradiation de 30 Gy sont reportés dans le Tableau N°VI. Une diminution très légère de la densité osseuse trabéculaire était fréquemment observée au sein des os avec ou sans défaut osseux quelque soit le délai ; cette diminution était plus importante au fur et à mesure au sein des os avec défaut osseux. Une cicatrisation anormale des défauts osseux était observée dans la majorité des cas, caractérisée par une modification de la densité trabéculaire et par un liseré d'ostéocondensation en périphérie du défaut osseux dans un tiers des cas (Figure N°6B).

- **Observations radiologiques après une irradiation de 45 Gy**

Les résultats des examens radiologiques après une irradiation de 45 Gy sont reportés dans le Tableau N°VII. Une diminution très légère de la densité osseuse trabéculaire était très

fréquemment observée au sein des os avec ou sans défaut osseux quelque soit le délai ; cette diminution était plus importante au fur et à mesure au sein des os avec défaut osseux. Une cicatrisation anormale des défauts osseux était observée dans la majorité des cas, caractérisée par une modification de la densité trabéculaire et par la présence d'un liseré d'ostéocondensation en périphérie du défaut osseux dans la majorité des cas (Figure N°6C).

Section histologique	Examen histologique	Sacrifice (semaines)		
		12	18	24
Sans défaut osseux	Os normal	2 (50%)	4 (66,7%)	2 (50%)
	Os anormal	2 (50%)	2 (33,3%)	2 (50%)
Avec défaut osseux	Défaut non visible	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
	Défaut visible	4 (100%)	6 (100%)	3 (75%)
A distance du défaut osseux	Os normal	2 (50%)	2 (66,7%)	0 (0%)
	Os anormal	2 (50%)	4 (33,3%)	4 (100%)

**Tableau N°VI : observations radiologiques après une irradiation de 30 Gy**

Section histologique	Examen histologique	Sacrifice (semaines)	
		12	18
Sans défaut osseux	Os normal	2 (50%)	2 (33,3%)
	Os anormal	2 (50%)	4 (66,7%)
Avec défaut osseux	Défaut non visible	0 (0%)	0 (0%)
	Défaut visible	4 (100%) dont 1 fracture	6 (100%)
A distance du défaut osseux	Os normal	1 (25%)	1 (16,6%)
	Os anormal	3 (75%)	5 (83,4%)

**Tableau N°VII : observations radiologiques après une irradiation de 45 Gy**



**A**



**B**



**C**

**Figures N°6 : radiographies rétro-alvéolaires**

**A – Os non irradié**

**Radiographie d'un tibia et d'un fémur montrant un défaut osseux cicatrisé radiologiquement**

**B – Os irradié à 30 Gy**

**Radiographie d'un tibia et d'un fémur montrant un défaut osseux visible**

**C – Os irradié à 45 Gy**

**Radiographie d'un tibia et d'un fémur montrant un défaut osseux visible et un défaut osseux cicatrisé radiologiquement**

### 3.4.2. En fonction de la dose d'irradiation

Les résultats des examens radiologiques en fonction de la dose d'irradiation sont reportés dans le Tableau N°VIII.

Après une irradiation de 45 Gy, les radiographies montraient une diminution un peu plus fréquente et plus importante de la densité osseuse trabéculaire. Une cicatrisation anormale du défaut osseux était presque systématique après une irradiation de 30 Gy avec une modification de la densité osseuse du défaut et la présence dans 40% des cas d'un liseré d'ostéocondensation. Une cicatrisation anormale du défaut osseux était systématique après une irradiation de 45 Gy caractérisée par une modification de la densité osseuse du défaut et par la présence dans 70% des cas d'un liseré d'ostéocondensation.

L'augmentation des doses d'irradiation augmentait le taux d'altération osseuse.

Section histologique	Examen histologique	Dose d'irradiation (Gy)	
		30	45
Sans défaut osseux	Os normal	8 (57,2%)	4 (40%)
	Os anormal	6 (42,8%)	6 (60%)
Avec défaut osseux	Défaut non visible	1 (7,2%)	0 (0%)
	Défaut visible	13 (92,8%)	10 (100%)
A distance du défaut osseux	Os normal	4 (28,5%)	2 (20%)
	Os anormal	10 (71,5%)	8 (80%)

**Tableau N°VIII : observations radiologiques en fonction de la dose d'irradiation**

### 3.4.3. En fonction du défaut osseux

Les résultats des examens radiologiques en fonction de la réalisation d'un défaut osseux sont reportés dans le Tableau N°IX.

Une cicatrisation normale avec densité osseuse trabéculaire normale n'était observée que dans 1 cas après une irradiation. Les lésions radiologiques étaient 1,5 fois plus fréquentes au sein des os avec un défaut osseux.

La réalisation des défauts osseux augmentait les lésions osseuses radiologiques et les radiations ionisantes altéraient et retardaient la cicatrisation osseuse.

Section histologique	Examen histologique	Défaut osseux	
		Sans défaut osseux	Avec défaut osseux
Sans défaut osseux	Os normal	12 (50%)	
	Os anormal	12 (50%)	
Avec défaut osseux	Défaut non visible		1 (4,2%)
	Défaut visible		23 (95,8%)
A distance du défaut osseux	Os normal		6 (25%)
	Os anormal		18 (75%)

**Tableau N°IX : observations radiologiques en fonction du défaut osseux**

## **3.5. Observations histologiques**

### **3.5.1. Résultats**

« L'os normal » était un os ne présentant pas de modifications ou d'altérations histologiques. « L'os anormal » était un os présentant des modifications histologiques, en particulier au niveau de la moelle osseuse.

Le défaut osseux « non visible » correspondait à un défaut osseux cicatrisé histologiquement « sans cicatrice » ou « trace ». Le défaut osseux « visible » correspondait à un défaut osseux soit cicatrisé mais avec des « traces » soit non cicatrisé.

Une coupe histologique n'était pas exploitable (rat irradié à 30 Gy et euthanasié à 6 mois, fémur gauche) en raison d'un problème technique lors de la coloration.

- **Observations histologiques sans irradiation (Figure N°7A)**

Sans irradiation, l'histologie osseuse était normale, avec ou sans traumatisme. Les séquelles des défauts osseux étaient macro et microscopiquement invisibles. La cicatrisation des défauts osseux était caractérisée par la formation d'un os mature (Figure N°8A).

- **Observations histologiques après une irradiation de 30 Gy (Figure N°7B)**

Les résultats des examens histologiques après une irradiation de 30 Gy sont reportés dans le Tableau N°X. Un œdème médullaire précoce était fréquemment observé au sein des os avec ou sans défaut osseux (Figure N°8B1). Cet œdème devenait un fibroœdème à 18 semaines après l'irradiation. La médullaire était normale au sein des os avec ou sans défaut osseux à 24 semaines après l'irradiation. Une cicatrisation anormale des défauts osseux était observée dans plus de 50% des cas : une nécrose était observée au sein d'un des défauts osseux à 18 semaines après l'irradiation ; une cicatrisation fibreuse des défauts osseux sans ossification était observée dans les autres cas (Figure N°8B2).

- **Observations histologiques après une irradiation de 45 Gy (Figures N°7C1 et N°7C2)**

Les résultats des examens histologiques après une irradiation de 45 Gy sont reportés dans le Tableau N°XI. Des lésions histologiques étaient fréquemment observées au sein des os avec ou sans défaut osseux aux différents délais après irradiation. La moelle osseuse était

caractérisée par un œdème ou un fibroœdème et par une déplétion médullaire (Figure N°8C1). Seule une cicatrisation normale avec ossification était observée au sein des défauts osseux, Des cicatrisations inachevées étaient observées pour les 9 autres défauts osseux à 12 et 18 semaines après l'irradiation. Dans ces cas, l'analyse morphologique montrait un œdème ou une fibrose associés le plus souvent à une nécrose et sans ossification (Figure N°8C2).

Section histologique	Examen histologique	Sacrifice (semaines)		
		12	18	24
Sans défaut osseux	Os normal	1 (25%)	2 (33,3%)	4 (100%)
	Os anormal	3 (75%)	4 (66,7%)	0 (0%)
Avec défaut osseux	Défaut non visible	1 (25%)	3 (50%)	1 (33,3%)
	Défaut visible	3 (75%)	3 (50%)	2 (66,7%)
Autour du défaut osseux	Os normal	0 (0%)	2 (33,3%)	3 (100%)
	Os anormal	4 (100%)	4 (66,7%)	0 (0%)

**Tableau N°X : observations histologiques après une irradiation de 30 Gy**

Section histologique	Examen histologique	Sacrifice (semaines)	
		12	18
Sans défaut osseux	Os normal	2 (50%)	3 (50%)
	Os anormal	2 (50%)	3 (50%)
Avec défaut osseux	Défaut non visible	0 (0%)	1 (16,7%)
	Défaut visible	4 (100%) (25% fracture)	5 (83,3%)
Autour du défaut osseux	Os normal	0 (0%)	0 (0%)
	Os anormal	4 (100%)	6 (100%)

**Tableau N°XI : observations histologiques après une irradiation de 45 Gy**





A



B1



B2

**Figures N°7 : aspects macroscopiques des os**

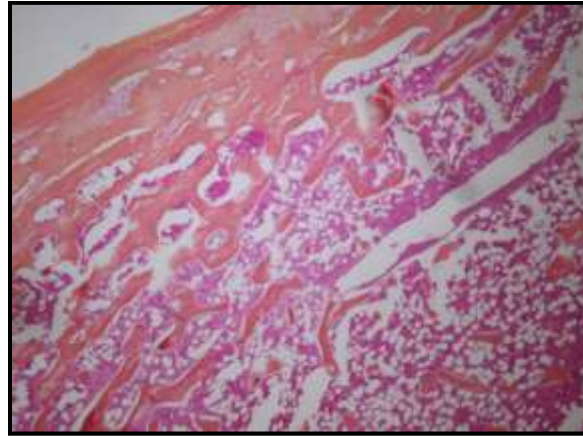
**A – Os irradié à 30 Gy**

**Examen macroscopique montrant un défaut osseux non cicatrisé**

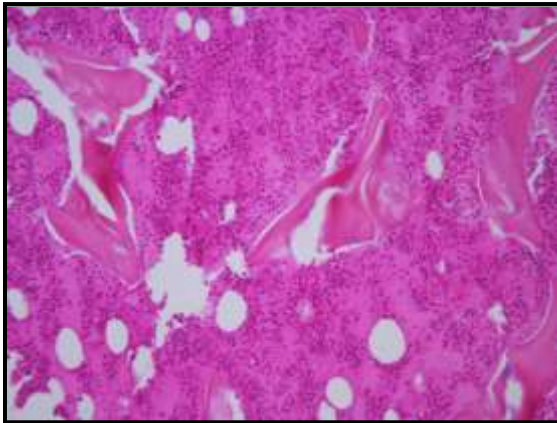
**B – Os irradiés à 45 Gy**

**B1- Examen macroscopique montrant un aspect de moelle totalement adipeuse et un défaut osseux sur 6 mm**

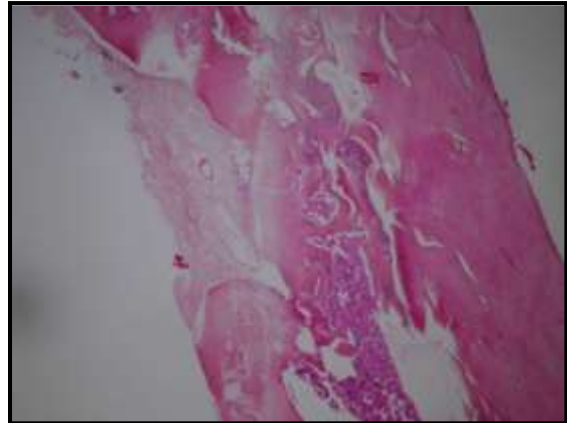
**B2- Examen macroscopique montrant un aspect de moelle en partie adipeuse et un défaut osseux non cicatrisé**



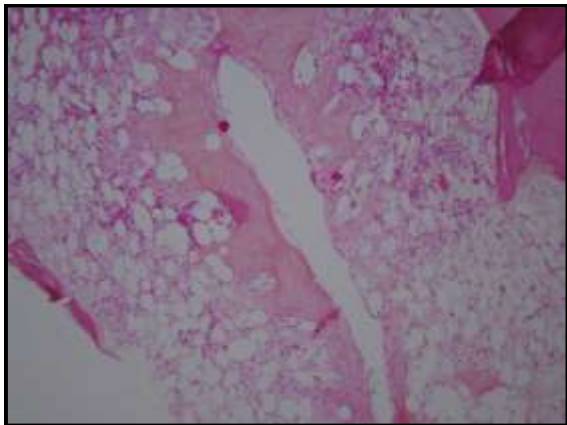
A



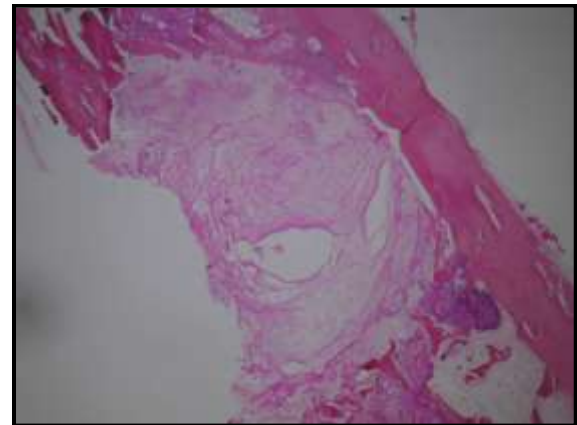
B1



B2



C1



C2

**Figures N°8 : aspects microscopiques**

**A – Os non irradié**

**Examen histologique montrant une cicatrisation du défaut osseux constituée d'os mature (X 100)**

**B – Os irradiés à 30 Gy**

**Examens histologiques montrant un œdème médullaire (1) (X 200) et une cicatrisation fibreuse du défaut osseux (2) (X 100)**

**C – Os irradiés à 45 Gy**

**Examens histologiques montrant un œdème médullaire (1) (X 200) et une cicatrisation fibreuse du défaut osseux associée à une nécrose (2) (X 100)**

### 3.5.2. En fonction de la dose d'irradiation

Les résultats des examens histologiques en fonction de la dose d'irradiation sont reportés dans le Tableau N°XII.

Après une irradiation de 45 Gy, la moelle osseuse semblait être plus altérée. Après une irradiation à 30 Gy, la moelle osseuse présentait un œdème focal et un fibroœdème. Après une irradiation de 45 Gy, la moelle osseuse présentait un œdème, un fibroœdème et une déplétion. Une cicatrisation normale ou fibreuse du défaut osseux était observée après une irradiation de 30 Gy. A l'opposé, une cicatrisation inachevée et une nécrose des défauts osseux étaient observées après une irradiation de 45 Gy.

L'augmentation des doses d'irradiation augmentait le taux d'altération osseuse.

Section histologique	Examen histologique	Dose d'irradiation (Gy)	
		30	45
Sans défaut osseux	Os normal	7 (50%)	5 (50%)
	Os anormal	7 (50%)	5 (50%)
Avec défaut osseux	Défaut non visible	5 (38,5%)	1 (10%)
	Défaut visible	8 (61,5%)	9 (90%)
Autour du défaut osseux	Os normal	5 (38,5%)	0 (0%)
	Os anormal	8 (61,5%)	10 (100%)

**Tableau N°XII : observations histologiques en fonction de la dose d'irradiation**

### 3.5.3. En fonction du défaut osseux

Les résultats des examens histologiques en fonction de la réalisation d'un défaut osseux sont reportés dans le Tableau N°XIII.

Une cicatrisation normale avec ossification des défauts osseux n'était observée que dans 26% des cas après une irradiation. Les lésions histologiques étaient 1,6 fois plus fréquentes au sein des os avec un défaut osseux.

La réalisation des défauts osseux augmentait les lésions osseuses histopathologiques et les radiations ionisantes altéraient et retardaient la cicatrisation osseuse.

Section histologique	Examen histologique	Défaut osseux	
		Sans défaut osseux	Avec défaut osseux
Sans défaut osseux	Os normal	12 (50%)	
	Os anormal	12 (50%)	
Avec défaut osseux	Défaut non visible		6 (26%)
	Défaut visible		17 (74%)
Autour du défaut osseux	Os normal		5 (21,75%)
	Os anormal		18 (78,25%)

**Tableau N°XIII : observations histologiques en fonction de la réalisation d'un défaut osseux**

## 4. DISCUSSION

---

Le premier objectif de cette étude a été d'évaluer radiologiquement et anatomopathologiquement les effets de très fortes doses d'irradiation sur les modifications histopathologiques et les processus de cicatrisation osseuses. Ces effets ont été étudiés en fonction de la dose d'irradiation délivrée et de la création ou non d'un défaut osseux. Le second objectif de cette étude a été de mettre au point un nouveau modèle animal d'ORN servant de base à l'évaluation de thérapeutiques d'ingénieries tissulaires osseuses.

Chez l'homme, les capacités compromises de cicatrisation d'un os irradié sont liées notamment aux effets cellulaires et vasculaires des radiations ionisantes. Les ostéoblastes et ostéoclastes sont quantitativement diminués après la radiothérapie [46,171] ; la différenciation terminale des ostéoblastes est quant à elle accélérée [171]. Diverses études ont montré que les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse sont également quantitativement diminuées par les radiations ionisantes [51]. La sclérose et la fibrose vasculaires sont des séquelles habituelles des radiations ionisantes [55,162,172]. La réparation osseuse spontanée est ainsi fortement compromise et réduite dans les aires irradiées ; les radiations ionisantes modifient la physiologie de la cicatrisation osseuse [33,46,64,171]. L'ORN constitue une des plus importantes complications de la radiothérapie, et son risque de survenue est majoré avec le temps [67,172]. Le traitement d'une ORN étendue repose sur un traitement chirurgical radical ; dans certains cas, une hémimandibulectomie doit être réalisée. De tels traitements induisent des défauts esthétiques et fonctionnels majeurs de la sphère oro-faciale. Ces défauts osseux peuvent éventuellement être reconstruits par des greffes osseuses autologues. Les lambeaux libres micro-anastomosés de fibula constituent une bonne méthode de reconstructions fonctionnelles des défauts osseux de la cavité buccale [173]. Cependant, les radiations ionisantes limitent le succès et les indications de ces lambeaux vascularisés [7,9]. Elles augmentent l'incidence des pseudarthroses et la morbidité associée est élevée. De plus, les greffes osseuses ne sont pas toujours réalisables, en particulier lorsque la qualité des vaisseaux est altérée [7,9]. Par ailleurs, certains patients ne peuvent bénéficier de telles interventions chirurgicales nécessitant une anesthésie générale prolongée. Les céramiques de phosphate de calcium apparaissent depuis de nombreuses années comme une alternative appropriée aux greffes osseuses et sont largement utilisées dans des applications

orthopédiques, maxillo-faciales et odontologiques [15]. Ces céramiques sont des substituts osseux synthétiques, biocompatibles, bioactifs et biodégradables présentant d'excellentes propriétés ostéoconductrices [15]. Pour tester de telles thérapeutiques chez l'homme, il était important de développer un modèle animal d'ORN.

Lors d'une irradiation cervico-céphalique chez l'homme, le développement d'une ORN se produit essentiellement au niveau de la mandibule. Cependant, la réalisation d'un modèle animal irradié au niveau mandibulaire n'a pas été effectuée en raison des difficultés d'application et des très fortes doses d'irradiation souhaitées. Une radiomucite risquait effectivement d'induire une impossibilité pour les animaux de s'alimenter [174]. Par ailleurs, ces animaux ne peuvent pas survivre à une dose d'irradiation cérébrale supérieure à 40 Gy (le cerveau aurait été inclus dans le champ d'irradiation mandibulaire) [33]. La petite taille des animaux n'a pas permis de concevoir une méthode de radioprotection encéphalique et médullaire suffisamment fiable. Nous avons ainsi développé un modèle d'irradiation au niveau des membres postérieurs. L'irradiation externe a été délivrée en une unique dose de 30 ou 45 Gy. Ces doses étaient équivalentes à 120 ou 180 Gy délivrés selon un séquençage multi fractionné. Ainsi, les doses d'irradiation délivrées étaient 2 à 3 fois celles habituellement utilisées dans le traitement de routine des carcinomes épidermoïdes des VADS chez l'homme (60 Gy délivrés de façon multi fractionnée correspondent à une dose thérapeutique classique). Chez l'homme, l'ORN mandibulaire est souvent associée à des facteurs prédisposant, tels que les infections dentaires, les lésions parodontales ou les avulsions dentaires [72,164,167]. Ainsi, des défauts osseux ont été créés dans notre modèle animal afin de reproduire un traumatisme comme lors d'une avulsion dentaire, acte chirurgical pouvant être à l'origine d'une ORN [72,167].

A notre connaissance, cette étude a été la première à tester de telles doses d'irradiation, qui ont induit d'importantes séquelles osseuses, doses dépendantes et traumatismes dépendantes. La cicatrisation des défauts osseux non irradiés était caractérisée par la formation d'un os mature, sans modification de la densité trabéculaire, ni liseré d'ostéocondensation. L'irradiation entraînait une diminution de la densité osseuse trabéculaire ; une diminution de la densité radiologique lors de la cicatrisation d'un défaut osseux était quasi systématique, excepté en périphérie où un phénomène d'ostéocondensation pouvait être observé. Cependant, la réalisation de radiographies ne permettait pas de caractériser qualitativement l'histologie et la cicatrisation osseuses. La différence la plus notable d'un point de vue radiologique entre les deux doses d'irradiation était la fréquence

plus importante du phénomène d'ostéocondensation lors d'une irradiation à 45 Gy. D'un point de vue anatomopathologique, la moelle osseuse ainsi que la cicatrisation osseuse semblaient être plus altérées lors d'une irradiation à 45 Gy. L'irradiation à 30 Gy induisait un œdème ou un fibroœdème médullaire ainsi qu'une cicatrisation osseuse normale ou fibreuse sans ossification. Une irradiation à 45 Gy induisait un œdème ou un fibroœdème ainsi qu'une déplétion médullaire ; la cicatrisation des défauts osseux était altérée et caractérisée par de l'œdème et de la fibrose associés le plus souvent à une nécrose et sans ossification.

La réalisation d'un défaut osseux pouvait être considérée comme un traumatisme supplémentaire à l'irradiation. L'altération de la cicatrisation osseuse était localisée au sein du défaut osseux créé et ne semblait pas s'étendre au-delà. Parallèlement, la formation d'une ostéocondensation périphérique pourrait être considérée comme un mécanisme de défense de l'organisme du rat ; chez l'homme, des phénomènes de condensation osseuse puis de séquestration osseuse se produisent parfois [4,5]. Nous pouvons ainsi considérer que la création d'un défaut osseux au sein d'un os préalablement irradié à 45 Gy produit un bon modèle d'ORN localisée. Un des objectifs de ce travail était également de pouvoir utiliser ce modèle animal d'ORN pour tester différentes thérapies basées sur l'ingénierie tissulaire osseuse. De nouvelles technologies sont développées pour la réparation et la reconstruction osseuses, associant des cellules de moelle osseuse à des biomatériaux [19,118]. Des études précédentes ont montré que les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse pouvaient être associées et cultivées sur des biomatériaux ; elles menaient à une différenciation ostéoblastique sous conditions ostéogéniques et procuraient des propriétés ostéoconductrices aux biomatériaux après implantation *in vivo* [52,152]. Ces matériaux hybrides formés servent pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Les défauts osseux réalisés dans cette étude sont appropriés pour l'implantation de substituts osseux synthétiques [175]. L'utilisation d'une race de rates consanguines (Lewis 1A-haplotype RT1<sup>a</sup>) permet la réalisation de greffes de cellules de moelle osseuse ; en effet, ces animaux présentent la propriété de pouvoir recevoir une allogreffe de moelle osseuse se comportant immunologiquement comme une autogreffe, ce qui exclut le risque de « Graft Versus Host Disease » (GVHD ou maladie du greffon contre l'hôte) ; aucun traitement immunosuppresseur n'est nécessaire lors de l'utilisation de ce modèle de rat [176]. Ainsi, le développement de ce modèle apparaît parfaitement fiable et adapté pour évaluer les nouvelles thérapies d'ingénieries tissulaires osseuses, en particulier dans le cas de tissu osseux à faible trophicité comme l'os séquellaire d'irradiation.

## 5. CONCLUSION

---

Cette étude avait pour objectif d'évaluer d'un point de vue fondamental les caractéristiques anatomopathologiques et radiologiques de l'os irradié et de la cicatrisation en terrain irradié.

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de mieux caractériser les changements radiologiques et surtout histologiques liés à une irradiation osseuse ainsi que la cicatrisation de ces défauts osseux. Les résultats confortent également des données déjà acquises : la radiothérapie altère et retarde la cicatrisation osseuse.

Le modèle animal irradié à 45 Gy au niveau de ses membres postérieurs et ayant subi un traumatisme osseux peut être considéré comme un modèle animal fiable d'ORN localisée et permettant de tester les thérapeutiques d'ingénieries tissulaires osseuses.

Le modèle animal de perte de substance osseuse préalablement irradiée mis à profit dans cette première partie se révèle également séduisant pour évaluer l'apport de biomatériaux dans les processus de cicatrisation et reconstruction osseuses en territoire irradié. Ce modèle permet en effet d'envisager la variation de multiples paramètres :

- soit liés à l'irradiation : à différentes doses (thérapeutiques ou supra-thérapeutiques) et à différents temps opératoires (préopératoires ou post-opératoires)...
- soit liés au matériau : injectable, non injectable (granules, blocs) ...
- soit liés à une association de cellules : moelle osseuse totale ou sélection de cellules.

Les doses d'irradiation utilisées dans cette première étude constituent des doses supra-thérapeutiques à celles délivrées chez l'homme pour le traitement des carcinomes épidermoïdes des VADS. Le développement d'un tel modèle animal permet de nouvelles perspectives et notamment de tester diverses thérapeutiques d'ingénieries tissulaires osseuses.

La reconstruction osseuse par l'implantation de l'association d'un biomatériau injectable et d'une greffe de moelle osseuse totale a été évaluée en territoire irradié à des doses d'irradiation thérapeutique.





### **III. TROISIEME PARTIE :**

**ETUDE DE L'ASSOCIATION IBS - MOELLE OSSEUSE  
IMPLANTEE EN SITE OSSEUX APRES IRRADIATION**

## 1. CONTEXTE D'ETUDE

---

Le traitement de la plupart des carcinomes épidermoïdes des VADS nécessite un traitement chirurgical associé à une irradiation post-chirurgicale ; ces traitements produisent souvent des défauts esthétiques et fonctionnels majeurs au niveau de la sphère oro-faciale [28,162]. Une chirurgie d'exérèse est parfois également nécessaire pour réséquer une récurrence tumorale survenant en territoire préalablement irradié ou pour traiter une ostéoradionécrose [72].

La chirurgie reconstructrice s'est largement développée ces dernières années ; de nombreuses techniques de reconstruction peuvent être utilisées après résection chirurgicale [6,81]. Les lambeaux libres micro-anastomosés de fibula sont préconisés pour les reconstructions fonctionnelles de la cavité orale et sont parfaitement adaptés pour les reconstructions mandibulaires [173]. Cependant, l'utilisation de greffes osseuses autologues contraint à l'utilisation d'un site de prélèvement supplémentaire, à une anesthésie générale prolongée et augmente ainsi la morbidité pour le patient. Par ailleurs, la radiothérapie produit des effets secondaires irréversibles au niveau de l'os, impliquant une altération de ses propriétés de réparation, des complications infectieuses, des retards de cicatrisation ou encore des ostéoradionécroses [172] ; ainsi, les radiations ionisantes limitent le succès des lambeaux vascularisés [7,9] et de nombreux patients ne peuvent bénéficier de tels traitements.

Les objectifs thérapeutiques sont ainsi de trouver des alternatives aux greffes osseuses autogènes. En terrain préalablement irradié, peu d'études ont évalué la réparation osseuse à l'aide de substituts osseux synthétiques. Les phosphates de calcium biphasés (BCP) sont des substituts osseux synthétiques largement utilisés dans des applications orthopédiques, maxillo-faciales et odontologiques ; ce sont des matériaux biocompatibles, bioactifs et biodégradables présentant d'excellentes propriétés ostéoconductrices [15].

Cette étude a fait suite à une précédente expérimentation réalisée dans le laboratoire par O. Malard et Coll. [19,169] ; elle a évalué la réparation osseuse chez le rat, en terrain préalablement irradié, à l'aide d'une association de granules de BCP et d'une greffe de moelle

osseuse totale. Les résultats de cette étude ont été très encourageants [19,169]. Nous avons ainsi souhaité poursuivre les travaux de recherche en évaluant un nouveau biomatériau : l'IBS, qui est injectable et qui a donc la particularité de parfaitement se mouler au défaut osseux créé. Ce matériau a été développé pour permettre une chirurgie moins invasive [104-106], propriété particulièrement intéressante en territoire irradié. L'IBS consiste en une association de granules de BCP et d'un polymère cellulosique [104-107] ; il présente des propriétés ostéoconductrices supérieures à celles de céramiques macroporeuses [105,106,110].

L'objectif principal de cette étude a été ainsi de déterminer l'influence sur la réparation osseuse de greffes de moelle osseuse associées à un biomatériau injectable, l'IBS, comme substitut osseux dans un os préalablement irradié. Le modèle animal présenté dans l'étude précédente a ainsi été choisi en utilisant une irradiation à dose thérapeutique.

## 2. MATERIEL ET METHODES

---

### 2.1. Préparation du matériau

#### 2.1.1. Préparation de l'IBS (Injectable Bone Substitute)

##### 2.1.1.1. Généralités

Le matériau de substitution osseuse utilisé dans cette étude était l'Injectable Bone Substitute (IBS) fourni par la société Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France).

##### 2.1.1.2. Composition

L'IBS est un matériau de comblement osseux qui associe une phase minérale sous forme de grains de phosphate de calcium biphasé (BCP, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France) (50%) à une phase vectrice organique d'Hydroxy-Propyl-Methyl-Cellulose (Benecel<sup>®</sup>, Aqualon-Hercules, France) (50%).

##### ➤ La phase minérale

La phase minérale est constituée de granules de BCP associant 60% d'Hydroxyapatite à 40% de phosphate  $\beta$  tricalcique. La granulométrie utilisée dans cette étude était de 40 à 80  $\mu\text{m}$  de diamètre habituellement utilisée pour les applications en Odontologie (lot 0901).

##### ➤ La phase vectrice

La phase vectrice, ou solution aqueuse de polymère, est constituée d'une solution visqueuse d'Hydroxy-Propyl-Methyl-Cellulose (HPMC) à 3% dans une solution physiologique isotonique (lot OH30012N11-230403-3).

##### 2.1.2. Stérilisation de l'IBS

Le biomatériau était conditionné en seringues à usage unique, prêtes à l'emploi, stérilisées à 121°C pendant 20 minutes et emballées en sachet hermétiquement clos.

## **2.2. Animaux**

Vingt-sept rates consanguines de souche Lewis A1-haplo type RT1<sup>a</sup> (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France) ont été utilisées. Les animaux âgés de 8 semaines et d'un poids  $\geq 225$  grammes ont été acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. L'ensemble de l'expérimentation animale a été mené au sein de l'unité thérapeutique expérimentale de la Faculté de Médecine de Nantes (UTE, IFR 26).

Les rates ont été placées dans des cages standards dans un local à température constante de 21°C et soumis à des cycles de 12/12h d'éclairage-obscurité. Les animaux ont été alimentés avec une nourriture de laboratoire standard et ont reçu de l'eau *ad libitum*.

La stabulation des rates et l'expérimentation ont été conduites dans le respect de la directive européenne réglementant la conduite des expérimentations animales (directive européenne n°86/609/CEE).

## **2.3. Expérimentation**

### **2.3.1. Séparation des animaux**

Les animaux ont été séparés en trois groupes :

- Groupe N°1 : 3 rates donneuses de moelle osseuse.
- Groupe N°2 : 12 rates irradiées.
- Groupe N°3 : 12 rates contrôles (non irradiées).

### **2.3.2. Procédure d'irradiation**

#### **2.3.2.1. Généralités**

L'irradiation externe des animaux a également été effectuée au Centre Régional de la Ligue Contre le Cancer (CRLCC René Gauducheau, Nantes, France) sur le même irradiateur que dans la précédente étude.

### **2.3.2.2. Réalisation pratique**

L'irradiation externe a concerné les 12 animaux du groupe N°2. Elle a été réalisée à J0 sous anesthésie générale. Les animaux non irradiés n'ont pas été anesthésiés.

La procédure pratique de l'irradiation externe était la même que dans la précédente étude. Les rates ont été placées sous le champ d'irradiation par groupe de 6. La source de Cobalt 60 a été placée à 60 cm des animaux. La dose d'irradiation souhaitée était de 15 Gy. Le calcul du temps d'exposition nécessaire à la dose d'irradiation souhaitée a été effectué par le service de biophysique du CRLCC. Elle a été délivrée selon un fractionnement d'une unidose de 15 Gy et l'exposition nécessaire pour l'obtention de cette dose a été calculée à 19 minutes le jour de l'irradiation.

### **2.3.3. Procédure chirurgicale et implantation**

#### **2.3.3.1. Généralités et répartition des implants**

La réalisation de défauts osseux et l'implantation ont été effectuées trois semaines après l'irradiation (J21). Elles ont concerné les rates des groupes N°2 et N°3, soit chez 24 des 28 animaux inclus dans cette étude (96 défauts osseux, 48 en terrain non irradié, 48 en terrain irradié).

Quatre conditions ont été évaluées sur chacun des 2 groupes : défauts osseux non comblés et servant de groupe témoin, défauts osseux comblés soit par de la moelle osseuse seule, soit par de l'IBS seul, soit par l'association de moelle osseuse et d'IBS. Les comblements ont été effectués jusqu'à la corticale externe des défauts osseux créés.

Un animal du groupe N°1 a été utilisé pour obtenir la moelle osseuse nécessaire au myélogramme et à la numération médullaire, les deux autres ont quant à eux servi à l'obtention de la moelle osseuse nécessaire aux comblements. Ces animaux n'ont été ni irradiés, ni implantés.

La répartition des animaux et des comblements est rapportée dans le Tableau N°XIV.

Groupe N°	Rate N°	Irradiation	Implantation			
			Fémur droit	Tibia droit	Fémur gauche	Tibia gauche
2	1	Irradiée	MO	IBS	MO + IBS	Témoin
	2	Irradiée	IBS	MO + IBS	Témoin	MO
	3	Irradiée	MO + IBS	Témoin	MO	IBS
	4	Irradiée	Témoin	MO	IBS	MO + IBS
	5	Irradiée	MO	IBS	MO + IBS	Témoin
	6	Irradiée	IBS	MO + IBS	Témoin	MO
	7	Irradiée	MO + IBS	Témoin	MO	IBS
	8	Irradiée	Témoin	MO	IBS	MO + IBS
	9	Irradiée	MO	IBS	MO + IBS	Témoin
	10	Irradiée	IBS	MO + IBS	Témoin	MO
	11	Irradiée	MO + IBS	Témoin	MO	IBS
	12	Irradiée	Témoin	MO	IBS	MO + IBS
3	13	Non irradiée	MO	IBS	MO + IBS	Témoin
	14	Non irradiée	IBS	MO + IBS	Témoin	MO
	15	Non irradiée	MO + IBS	Témoin	MO	IBS
	16	Non irradiée	Témoin	MO	IBS	MO + IBS
	17	Non irradiée	MO	IBS	MO + IBS	Témoin
	18	Non irradiée	IBS	MO + IBS	Témoin	MO
	19	Non irradiée	MO + IBS	Témoin	MO	IBS
	20	Non irradiée	Témoin	MO	IBS	MO + IBS
	21	Non irradiée	MO	IBS	MO + IBS	Témoin
	22	Non irradiée	IBS	MO + IBS	Témoin	MO
	23	Non irradiée	MO + IBS	Témoin	MO	IBS
	24	Non irradiée	Témoin	MO	IBS	MO + IBS
1	25	Non irradiée	Donneuse de moelle osseuse			
	26	Non irradiée	Donneuse de moelle osseuse			
	27	Non irradiée	Donneuse de moelle osseuse			

**Tableau N°XIV : répartition des animaux et des sites d'implantation**



### 2.3.3.2. Prélèvement de la moelle osseuse

Le prélèvement de moelle osseuse a été effectué sur les animaux du groupe N°1 spécialement désignés comme donneurs de moelle osseuse. Ce prélèvement a été réalisé sous anesthésie générale. L'induction anesthésique a été réalisée en chambre close par inhalation d'isoflurane (Forène<sup>®</sup>, laboratoire Abott, Rungis, France) à 3%, puis entretenue par la poursuite de l'inhalation au masque à une concentration de 1,5 à 2%.

Le prélèvement de moelle osseuse a été effectué selon la séquence suivante :

- rasage des membres inférieurs, désinfection cutanée à la polyvidone iodée (Bétadine<sup>®</sup>, Astra Médica, Mérignac, France),
- dissection et prélèvement de chaque fémur en condition d'asepsie chirurgicale,
- section du fût aux extrémités épiphysaires distale et proximale,
- recueil extemporané du contenu médullaire : instillation de 1 ml de sérum physiologique dans l'extrémité proximale du fût et recueil du contenu à l'extrémité opposée déclive par entraînement,
- injection de la moelle osseuse obtenue dans un tube hépariné Vénoject II (Terumo Europe, Louvain, Belgique),
- euthanasie des animaux par injection létale intra-péritonéale de barbiturique rapide (200 mg de Thiopental sodique, Nesdonal<sup>®</sup>, Rhône-Mérieux, Lyon, France).

Deux ml de moelle osseuse ont été conservés pour effectuer un comptage de la population cellulaire en présence : les cellules ont été centrifugées (1500 tours/minutes pendant 10 minutes à 20°C) puis comptées sur cellule de Malassez, permettant de déterminer la numération médullaire. Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules/mm<sup>3</sup>.

Deux ml de moelle osseuse ont été conservés pour effectuer un étalement sur lame par frottis afin d'exécuter une étude cytologique du myélogramme permettant de connaître la formule médullaire (Dr Garand, laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, France). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules correspondant à chaque type cellulaire.

Deux ml de moelle osseuse ont été utilisés pour effectuer les comblements de moelle osseuse seule. Deux ml de moelle osseuse ont été utilisés pour effectuer les comblements associant moelle osseuse et IBS. Le mélange MO + IBS a été réalisé à l'intérieur du tube hépariné Vénoject II selon un volume ratio de 1/1.

### **2.3.3.3. Création des défauts osseux et implantation**

Trois semaines après la procédure d'irradiation (J21), la procédure chirurgicale a été réalisée sur tous les animaux, irradiés et non irradiés (groupes N°2 et N°3). Cette procédure a été effectuée de façon concomitante avec le prélèvement de moelle osseuse, sous anesthésie générale. La procédure chirurgicale a été réalisée selon le même protocole opératoire que dans l'étude précédente. La création des défauts osseux et l'implantation ont été réalisées des deux côtés (Figures N°9A).

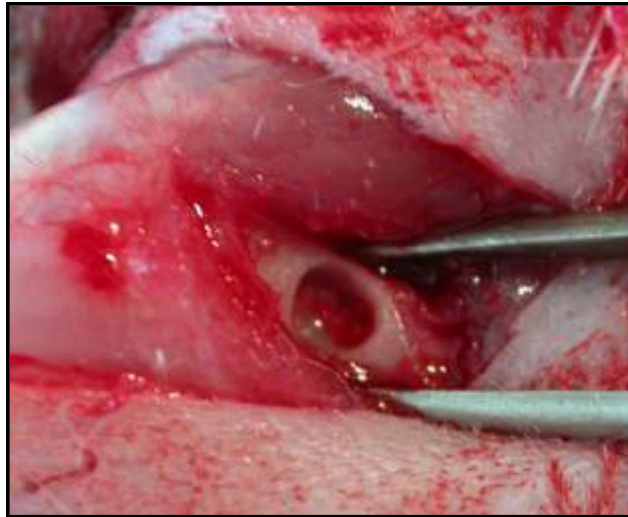
Une partie des défauts osseux a servi de groupe témoin (défauts osseux non comblés (Figure N°9C)). Les autres défauts osseux ont été comblés par :

- de la moelle osseuse seule, ou
- de l'IBS seul (Figure N°9B), ou
- d'une association IBS et moelle osseuse.

Le comblement des défauts s'est effectué de la profondeur à la superficie jusqu'à la corticale externe (répartition exposée dans le Tableau N°XIV).

### **2.3.3.4. Stabulation**

La stabulation des animaux a été identique à celle de l'étude précédente.



A



B



C

**Figures N°9 : création des défauts osseux et implantation**

**A - Création d'un défaut osseux en site fémoral chez le rat**

**B - Implantation à l'IBS d'un défaut osseux en site fémoral chez le rat**

**C - Explant d'un tibia irradié témoin**

### 2.3.4. Euthanasie et prélèvement des échantillons

A trois semaines de l'implantation et six semaines de l'irradiation (J42), les 24 rates (groupes N°2 et N°3) ont été euthanasiées de la même façon que dans l'étude précédente.

Après désinfection cutanée à la polyvidone iodée (Bétadine<sup>®</sup>, Astra Médica, Mérignac, France), le prélèvement des fémurs droits et gauches et des tibias droits et gauches a été effectué à l'aide d'une instrumentation stérile. Les pièces osseuses ont été directement placées dans un milieu fixateur composé de para formaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate (PBS, Seromed, Berlin, Allemagne) pendant 72 heures.

### 2.3.5. Synthèse de l'expérimentation

La chronologie irradiation-implantation-explantation est rappelée dans la Figure N°10.

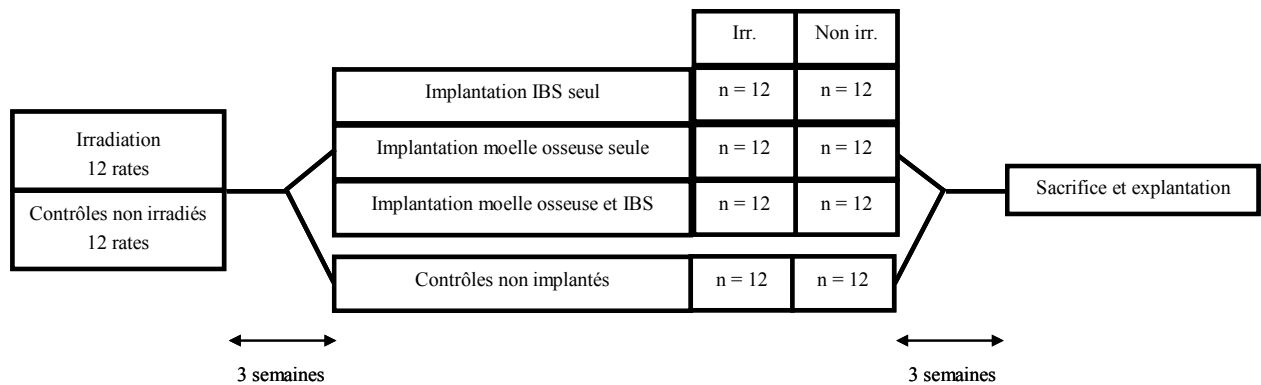


Figure N°10 : résumé du déroulement chronologique de l'expérimentation

## **2.4. Etude des explants**

### **2.4.1. Préparation des échantillons**

#### **2.4.1.1. Inclusion dans une résine de Méthyl-Méthacrylate**

- **Généralités**

Tous les prélèvements ont été inclus sans décalcification dans une résine Méthyl-Méthacrylate (MMA) (Osi Produits Chimiques, Saint-Quentin Fallavier, France) destinée à deux techniques différentes : colorations histo-morphométriques (Solochrome-Cyanine R) et étude en Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

- **Technique de l'inclusion (Annexe N°2)**

Après une période de 72 heures, les 4 explants obtenus sur chacun des 24 animaux (96 échantillons) ont été préparés.

La déshydratation a été réalisée par passages successifs dans 5 bains d'éthanol de degré croissant (70, 80, 90, 95 puis 100°). La durée de séjour dans chaque bain a été d'¼ d'heure et deux bains successifs à 100° ont été réalisés.

Une résine acrylique (Méthyl-Méthacrylate purifié (PMMA)) a été utilisée pour l'imprégnation des échantillons. Les échantillons ont été imprégnés dans un premier temps dans un bain de 50% d'alcool à 100° et de 50% de PMMA pendant 24 heures à 4°C, puis dans un second temps dans un bain de PMMA pur pendant 24 heures à 4°C.

L'inclusion des échantillons a été réalisée par deux étapes successives.

- La première étape a consisté à placer les échantillons au centre de flacons en verre remplis d'une solution de 90% de PMMA, de 10% de dibutylphtalate et de 1% de Peroxyde de Benzoyle (Merck Produits Chimiques, Darmstadt, Allemagne). Ces flacons ont été placés dans une cloche à vide pendant 2 heures, à 4°C.
- La seconde étape a consisté à placer les échantillons dans une solution de PMMA initiée par du N,N diméthyl-p-toluidine, selon un ratio de 10µl de N,N diméthyl-p-toluidine par ml de solution de PMMA. Les flacons en verre ont été fermés hermétiquement et immergés dans un cristalliseur rempli d'alcool à 70°. L'ensemble a été placé à -20°C pendant 24 heures. La polymérisation s'est poursuivie à température ambiante pendant 48 heures avant l'exploitation des échantillons inclus.

#### **2.4.1.2. Coupe des échantillons**

Les échantillons ont été coupés selon leur sens transversal à l'aide d'un disque diamanté (Hyperflex 220, réf. 940, Komet®, France) de façon à obtenir des blocs centrés juste avant la zone implantée.

Des coupes de 15 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome tissus durs (Reichert-Jung Supercut 2050, Cambridge instruments GmbH, Allemagne) jusqu'au milieu de la zone implantée sur chaque échantillon.

La partie résiduelle de l'échantillon a été utilisée pour l'analyse au MEB.

#### **2.4.2. Colorations et étude histologique**

L'étude histomorphométrique a été réalisée sur microscope photonique après coloration des coupes de 15 µm au Solochrome-Cyanine R (coloration décrite en Annexe N°3).

Une fois colorées, les coupes ont été montées entre lames et lamelle avec une ou deux gouttes de toluène à l'aide d'une colle de montage Eukitt (Labo Nord, Villeneuve d'Asq, France) et ont été examinées au microscope photonique (Olympus BH2, Japon).

Les observations histologiques ont été effectuées afin de déterminer les interactions entre l'os et le matériau et la morphologie de la néoformation osseuse.

#### **2.4.3. MEB et analyse d'image**

##### **2.4.3.1. Le polissage des échantillons**

Les surfaces des coupes résiduelles ont été polies à l'aide de disques abrasifs de rugosité décroissante (grains 800, 1200, 2500 et 4000) sur polisseuse DP 10 (Struers, France), à 125 tr/mn sous irrigation d'eau.

#### **2.4.3.2. La métallisation des échantillons**

La surface polie des blocs a été métallisée avec de l'or-palladium à  $1,5 \cdot 10^{-1}$  Torr sous une tension de 20 mA pendant 3,5 minutes à l'aide d'un métalliseur (Emscope AE 1230, Ashford, Angleterre).

La métallisation a pour but de recouvrir l'échantillon d'une fine couche d'un métal (5 à 6 nm d'épaisseur) de manière à le rendre conducteur et éviter son échauffement par la pénétration des électrons lors de l'analyse en MEB. Les atomes de l'alliage conducteur d'or et de palladium ont été arrachés par le bombardement des ions positifs du gaz argon et se sont donc déposés sur l'anode (représentée par l'échantillon).

#### **2.4.3.3. Acquisition des images**

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un MEB (Leo 1450 VP, Zeiss, Allemagne). Les échantillons ont été fixés sur le porte-objet par des pastilles collantes et un enregistrement de l'image de chaque échantillon a été effectué avec un grossissement de 20.

#### **2.4.3.4. Analyse d'image**

L'acquisition des données a été couplée à un logiciel d'analyse d'images (Leica microsystem imaging solution, Angleterre) Cette analyse d'image, basée sur une méthode de seuillage semi-quantitatif du niveau de gris, imposait un contraste suffisant entre le biomatériau, les espaces vides de tissus non minéralisés et l'os. L'analyse de nos échantillons a été restreinte à la zone implantée. L'image obtenue a permis de distinguer les granules de BCP qui apparaissent en blanc, l'os néoformé en gris, les espaces vides et tissus non minéralisés en noir.

#### 2.4.3.5. Paramètres mesurés

L'étude en microscopie électronique à balayage a permis une observation qualitative ultra structurale des explants, en particulier de l'interface entre l'os néoformé et les granules de BCP. Une étude quantitative basée sur l'analyse d'image semi-automatisée a été menée pour quantifier la formation de l'os de repousse et la résorption des granules de BCP.

Grâce au logiciel utilisé et au programme spécialement développé pour ce type d'études, l'analyse d'image a permis de mesurer les paramètres suivants :

- surface occupée par le biomatériau,
- surface occupée par l'os néoformé,
- surface occupée par les tissus non minéralisés,
- et surface totale analysée.

Ces valeurs, exprimées en unités de surface ( $\text{mm}^2$ ), ont ensuite été rapportées en pourcentage de la surface totale.

#### 2.4.3.6. Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) avec une comparaison multiple de moyennes (PLSD de Fisher) a été utilisée pour comparer la repousse osseuse en fonction des différentes conditions. Ce même test a été utilisé pour comparer la résorption des granules de BCP. Une différence a été considérée comme statistiquement significative pour une valeur p inférieure à 0,05.



### **3. RESULTATS**

---

#### **3.1. Techniques d'irradiation et d'implantation**

Il n'y a pas eu à déplorer de décès post-radique ou post-opératoire des animaux dans cette expérimentation.

Il n'y a pas eu non plus à déplorer de décès lié à l'anesthésie.

La procédure d'irradiation externe s'est déroulée sans difficulté particulière. La tolérance immédiate puis jusqu'à l'explantation a été bonne. Il n'y a pas eu d'incidents liés aux radiations ionisantes, en dehors des effets habituels (type radiodermite cutanée régressive). Aucun traitement spécifique n'a été nécessaire pour la prise en charge des effets secondaires de cette irradiation.

Aucune infection n'a été constatée après la chirurgie des animaux, ni même chez ceux préalablement irradiés. Il n'y a pas eu par ailleurs de manifestation de type Graft Versus Host Disease (GVHD) après la mise en place des greffes de moelle osseuse inter-individuelles.

### 3.2. Recueil et analyse de la moelle osseuse

Le recueil de la moelle osseuse s'est révélé simple.

La numération cytologique sur cellule de Malassez a montré que la population cellulaire était de  $51.10^6$  cellules médullaires/mm<sup>3</sup>. Les résultats montrent la conformité des myélogrammes des moelles osseuses prélevées avec les données publiées [177].

La formule médullaire est rapportée dans le Tableau N°XV.

Moelle fémorale	Lignée granulocytaire					Lignée érythroblastique		Lignée Mégacario-cytaire	Lymphocytes	Plasmocytes	Monocytes
	Myéloblastes	Promyélocytes neutrophiles	Myélocytes neutrophiles	Métamyélocytes neutrophiles	Polynucléaires	Pro érythro blastes	Erythro blastes				
	1,5	1,5	4	7,5	20	1,5	15	2	31,5	0	7

**Tableau N°XV : analyse cytologique du myélogramme de la moelle osseuse recueillie et implantée (résultats exprimés en pourcentage par type cellulaire)**

### 3.3. Etude histologique

L'analyse histologique a montré des résultats variables en fonction du comblement effectué et de la présence ou non d'une irradiation préalable.

Une néoformation osseuse a été observée au sein des défauts en quantité variable, excepté pour le groupe témoin (sans implantation) préalablement irradié dont les pertes de substances observées étaient vierges de néoformation osseuse.

Dans le groupe témoin non irradié, des travées osseuses issues de la profondeur du défaut étaient nettement individualisables, mais en petite quantité.

Dans le groupe non irradié et implanté avec de l'IBS, seul ou en association avec une greffe de moelle osseuse, une néoformation osseuse était visible à partir des berges de la perte de substance, en périphérie des granules ainsi qu'au contact de ces granules (Figure N°11A).

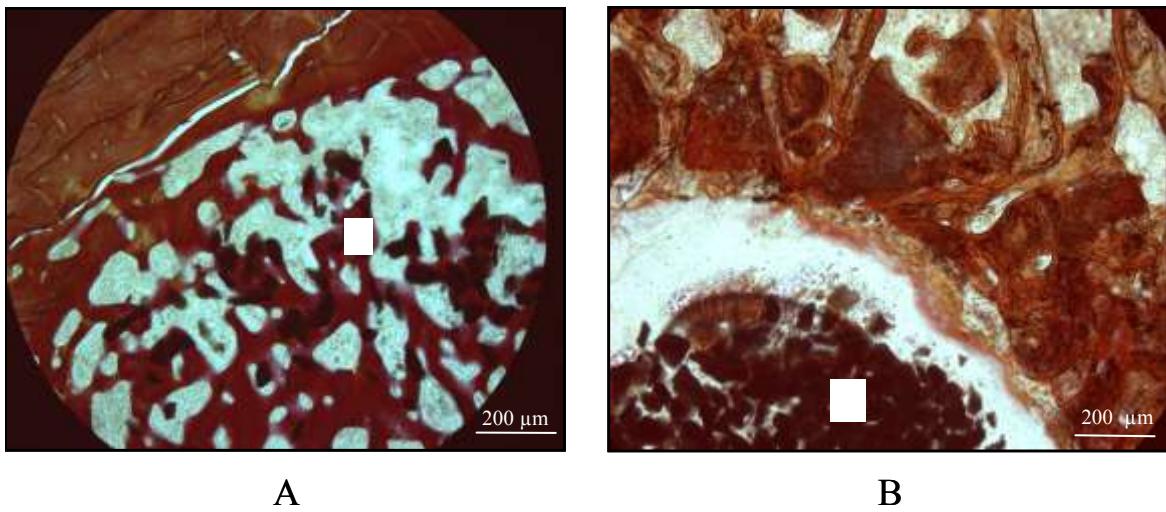
L'apport d'une greffe de moelle osseuse seule dans le groupe irradié a permis d'observer quelques rares travées osseuses, issues de la profondeur de la perte de substance mais ne parvenant pas jusqu'à la berge corticale du défaut.

Dans le groupe implanté avec de l'IBS seul et préalablement irradié, de très rares travées osseuses étaient présentes et étaient issues de la profondeur de la perte de substance. Elles n'étaient situées que rarement en périphérie ou au contact des granules.

Dans le groupe de rats irradiés et dont l'implantation était de l'IBS associé à une greffe de moelle osseuse, une néoformation osseuse était visible à partir des berges de la perte de substance, en périphérie des granules ainsi qu'au contact de ces granules.

Au sein des groupes non irradiés, quelque soit l'implantation réalisée ou l'absence d'implantation, il n'y avait pas de processus fibreux visible à leur niveau ni de prolifération cellulaire inflammatoire.

Au sein des groupes irradiés, un processus fibreux plus ou moins important et plus ou moins permanent était visible au sein des pertes de substance. Dans le groupe implanté avec de l'IBS seul en territoire irradié, une sorte d'encapsulation fibreuse de l'IBS était présente et le peu d'os néoformé ne présentait que rarement un contact direct avec les granules de BCP (Figure N°11B). Seul le groupe dont l'IBS était associé à une greffe de moelle osseuse n'a présenté que très rarement et très partiellement ce phénomène de fibrose ; par ailleurs l'os de repousse était en contact direct avec les granules de BCP.



**Figures N°11 : colorations Solochrome-Cyanine R**

**A - Echantillon avec perte de substance implantée par de l'IBS seul en l'absence d'irradiation préalable : formation osseuse trabéculaire en périphérie du défaut implanté et dans les espaces profonds du défaut (\* : granules de BCP)**

**B - Echantillon avec perte de substance implantée par de l'IBS seul après irradiation préalable : aspect d'encapsulation fibreuse des granules de BCP (\* : granules de BCP)**

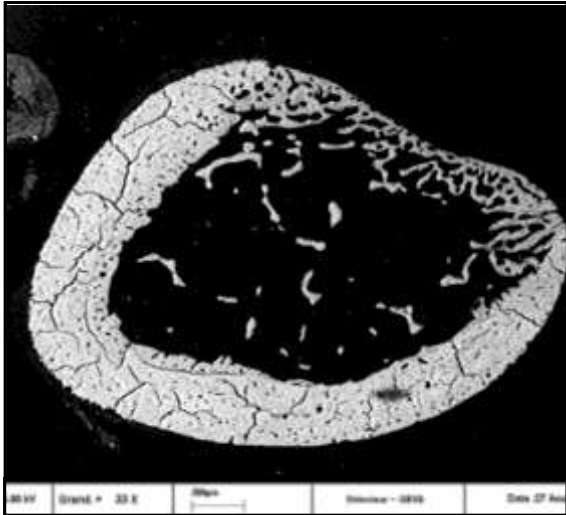
### **3.4. L'observation en Microscopie Electronique à Balayage**

#### **3.4.1. Etude de la repousse osseuse**

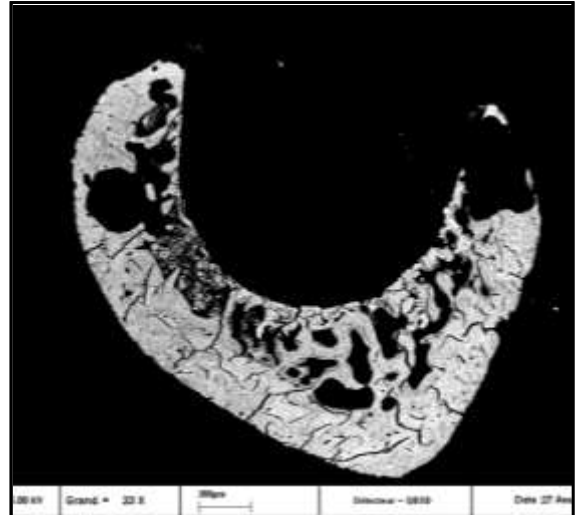
##### **3.4.1.1. Etude qualitative**

Une néoformation osseuse centripète a été observée au niveau des défauts osseux témoins non irradiés (Figure N°12A). Aucune néoformation osseuse n'a été observée dans les osseux témoins préalablement irradiés (Figure N°12B).

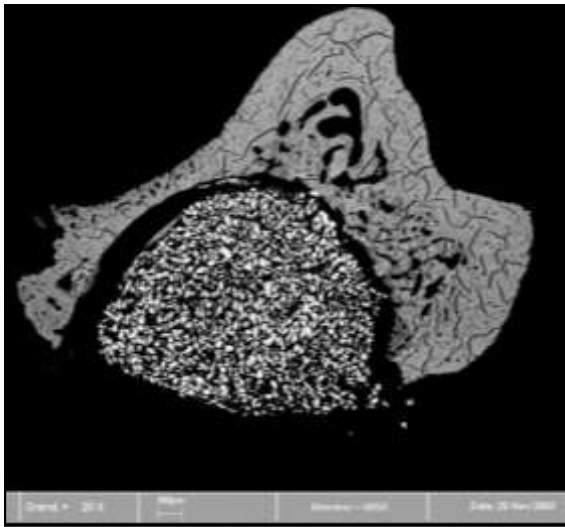
Les observations effectuées de l'interface os-matériau corroboraient les observations portées en microscopie photonique. Dans les défauts osseux irradiés et implantés avec de l'IBS seul, aucune néoformation osseuse n'a été observée ; par ailleurs, un liseré noir a été observé entre les granules de BCP et la périphérie de la zone implantée (Figure N°12C) ; ce liseré noir était constitué de tissu non minéralisé. Un contact intime a été observé entre les granules de BCP et l'os néoformé dans les défauts osseux non irradiés implantés avec de l'IBS seul ou de l'IBS associé avec une greffe de moelle osseuse ; ce contact intime était également observé dans les défauts osseux préalablement irradiés lorsque l'IBS était associé à une greffe de moelle osseuse (Figure N°12D) ; les observations ont montré que l'os néoformé poussait au contact des granules de BCP mais également dans les espaces inter-granulaires.



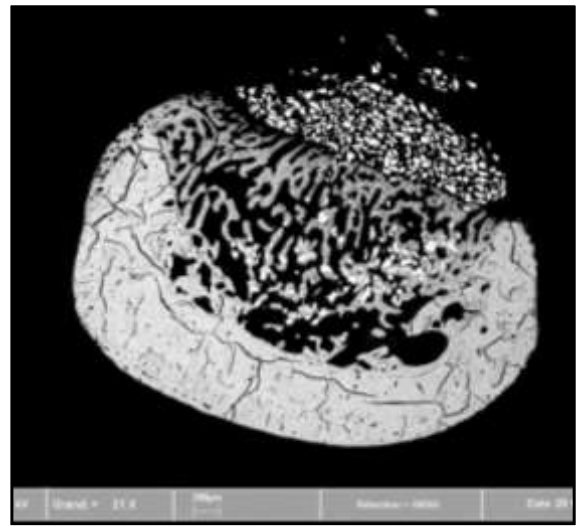
A



B



C



D

Figures N°12 : défauts osseux en MEB (bar = 200 μm)

**A – Echantillon témoin en l’absence d’irradiation préalable : la néoformation osseuse est peu abondante mais nettement observée au niveau de la perte de substance effectuée**

**B - Echantillon témoin après irradiation préalable : absence de néoformation osseuse individualisable au sein de la perte de substance**

**C – Echantillon avec perte de substance implantée par de l’IBS seul après irradiation : la néoformation osseuse est faible, il n’y a pas de contact entre les particules de BCP et la périphérie du défaut osseux**

**D – Echantillon avec perte de substance implantée par de l’IBS associé à des cellules de moelle osseuse après irradiation : la néoformation osseuse est plus abondante, un contact intime est observé entre l’os et les particules de BCP**

### 3.4.1.2. Etude quantitative

La quantité d'os néoformé était de  $8,59\% \pm 8,25$  dans les défauts osseux témoins en terrain non irradié, et de  $3,15\% \pm 3,28$  en terrain irradié.

La quantité d'os néoformé était de  $20,93\% \pm 10,50$  après implantation par l'IBS seul en terrain non irradié, et de  $6,9\% \pm 9,27$  en terrain irradié.

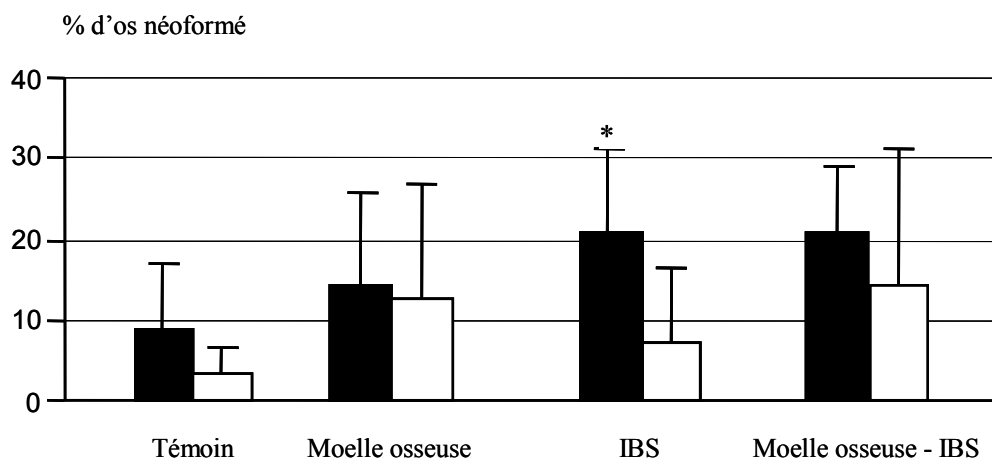
La quantité d'os néoformé était de  $14,41\% \pm 11,15$  après implantation par une greffe de moelle osseuse seule en terrain non irradié, et de  $12,47\% \pm 14,49$  en terrain irradié.

La quantité d'os néoformé était de  $20,93\% \pm 8,34$  après implantation par une greffe de moelle osseuse associé à l'IBS en terrain non irradié, et de  $14,29\% \pm 17,13$  en terrain irradié.

Les résultats quantitatifs et statistiques de la repousse osseuse sont rapportés dans les Tableaux N°XVI, XVII et XVIII et les Figures N°13, 14 et 15.

	Valeur de p							
	Témoin		MO seule		IBS		IBS + MO	
<b>Irradiés - non irradiés</b>	0,185	ns	0,695	ns	0,003	s	0,158	ns

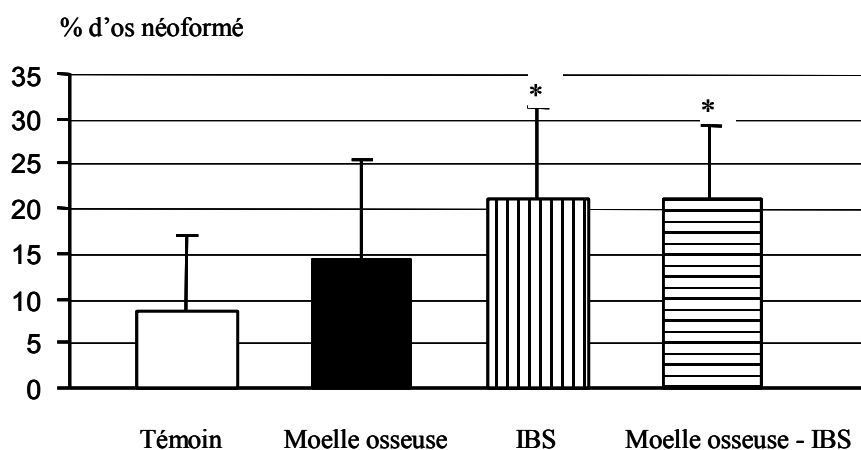
**Tableau N°XVI : résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction de l'irradiation**



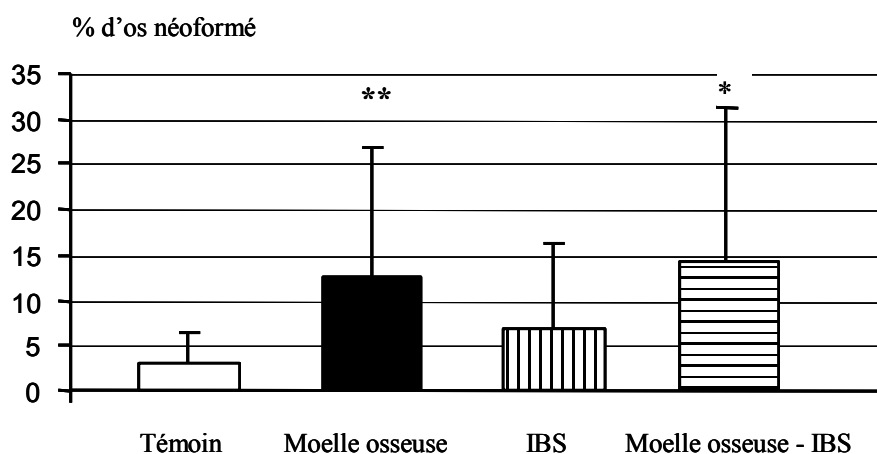
**Figure N°13 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux non irradiés (colonnes noires) et irradiés (colonnes blanches) en fonction des comblements effectués (\* :  $p < 0,01$ )**

	Valeur de p			
	Défauts irradiés		Défauts non irradiés	
<b>Témoin – IBS</b>	0,345	ns	0,010	s
<b>Témoin – IBS + MO</b>	0,008	s	0,010	s
<b>Témoin - MO seule</b>	0,025	s	0,243	ns
<b>IBS – IBS + MO</b>	0,109	ns	1	ns
<b>IBS - MO seule</b>	0,225	ns	0,191	ns
<b>IBS + MO – MO seule</b>	0,698	ns	0,191	ns

**Tableau N°XVII : résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction du type de comblement effectué**



**Figure N°14 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux non irradiés (\* :  $p < 0,01$  versus Témoin)**



**Figure N°15 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux irradiés (\* :  $p < 0,01$  versus Témoin, \*\* :  $p < 0,05$  versus Témoin)**



	Valeur de p	
<b>Témoin non irradié – IBS + MO irradié</b>	0,226	ns
<b>MO non irradié – IBS + MO irradié</b>	0,979	ns
<b>IBS non irradié – IBS + MO irradié</b>	0,158	ns
<b>IBS + MO non irradié – IBS + MO irradié</b>	0,158	ns

**Tableau N°XVIII : résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction de l'apport de moelle osseuse**

L'association d'une greffe de MO à l'IBS en territoire irradié permet l'obtention d'une néoformation osseuse équivalente à celle obtenue en territoire non irradié implanté avec de l'IBS seul.

### **3.4.2. Etude de la dégradation du matériau**

#### **3.4.2.1. Généralités**

La quantité de granules de BCP restant était de  $13,11\% \pm 5,80$  après implantation par l'IBS seul en terrain non irradié, et de  $17,81\% \pm 8,97$  en terrain irradié.

La quantité de granules de BCP restant était de  $8,49\% \pm 6,38$  après implantation par une greffe de moelle osseuse associé à l'IBS en terrain non irradié, et de  $5,85\% \pm 10,53$  en terrain irradié.

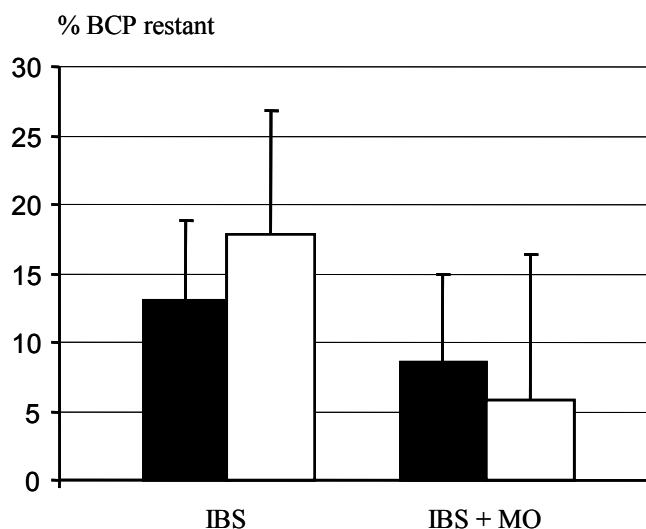
Les résultats quantitatifs et statistiques de la résorption du biomatériau sont rapportés dans les Tableaux N°XIX et XX et les Figures N°16 et 17.

#### **3.4.2.2. En fonction de l'irradiation**

Le pourcentage de BCP restant n'était pas différent entre les rats irradiés et les rats non irradiés, que ce soit avec l'IBS seul ( $p = 0,13$ ) ou l'IBS associé avec une greffe de moelle osseuse ( $p = 0,4$ ) (Tableau N°XIX et Figure N°16).

	Valeur de p			
	IBS		IBS + MO	
<b>Irradiés - non irradiés</b>	0,13	ns	0,4	ns

**Tableau N°XIX : dégradation de la céramique de BCP en fonction de l'existence d'une irradiation**



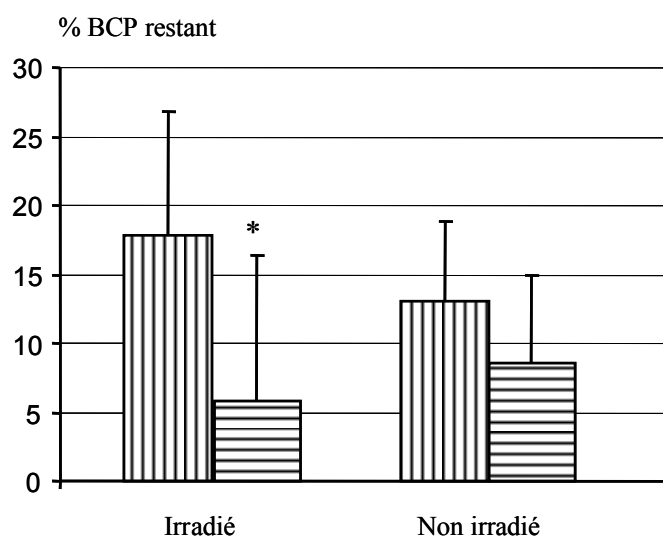
**Figure N°16 : dégradation de la céramique dans les défauts osseux non irradiés (colonnes noires) et irradiés (colonnes blanches) en fonction de l'existence d'une irradiation préalable. Les résultats sont exprimés en % de BCP restant dans la surface implantée**

### 3.4.2.3. En fonction de la greffe de moelle osseuse

Le pourcentage de BCP restant était significativement plus faible lorsque l'IBS était associé à une greffe de moelle osseuse chez les rats irradiés ( $p < 0,01$ ). Il n'y avait pas de différence significative dans le taux de dégradation de BCP lorsque l'IBS était associé à une greffe de moelle osseuse chez les rats non irradiés ( $p = 0,14$ ) (Tableau N°XX et Figure N°17).

	Valeur de p	
<b>IBS non irradié – IBS + MO non irradié</b>	0,146	ns
<b>IBS irradié – IBS + MO irradié</b>	0,0001	s

**Tableau N°XX : dégradation de la céramique de BCP en fonction de l'association d'une greffe de moelle osseuse**



**Figure N°17 : dégradation de la céramique en fonction de l'association d'une greffe de moelle osseuse à l'IBS (IBS seul : *colonnes traits verticaux* et IBS + greffe de moelle osseuse : *colonnes traits horizontaux*) (\* :  $p < 0,01$ )**

## 4. DISCUSSION

---

A notre connaissance, cette étude est la première à évaluer la reconstruction osseuse à l'aide d'un substitut osseux injectable associé à une greffe de moelle osseuse dans un os préalablement irradié.

Le modèle animal développé dans cette étude s'est efforcé de s'approcher au plus près des conditions de traitement oncologique de tumeurs localisées au niveau des VADS et avait pour objectif de reproduire les séquelles d'irradiation de l'os. Le recours à une race conventionnelle de rats type Wistar s'est révélé impossible. Les fémurs autologues de chaque rat constituent un modèle validé pour le prélèvement de moelle osseuse. Cependant les animaux devaient être irradiés sur l'ensemble des membres inférieurs et une irradiation préalable modifie la qualité du prélèvement médullaire en l'appauvrissant [178]. Les fémurs n'étaient donc pas utilisables dans cette étude. L'obtention de moelle osseuse au niveau de l'humérus de rat ne s'est pas non plus révélée utilisable ; des essais préliminaires d'obtention de moelle osseuse par prélèvement huméral n'avaient pas permis d'obtenir un volume tissulaire suffisamment constant ni abondant [169]. La race de rats consanguins de souche Lewis A1-haplo type RT1<sup>a</sup> (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France) a ainsi été choisie en raison de sa tolérance à une allogreffe de moelle osseuse. Les gènes de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité de ces animaux sont croisés, ce qui leur confère la propriété de pouvoir recevoir une allogreffe de moelle osseuse se comportant immunologiquement comme une autogreffe, ce qui exclue le risque de « Graft Versus Host Disease » (GVHD ou maladie du greffon contre l'hôte) [176]. Ainsi, aucun traitement immunosuppresseur n'a été nécessaire pour cette étude et ce modèle de rat a permis d'éviter le rejet de greffe et la maladie du greffon contre l'hôte. La qualité et la richesse de la moelle osseuse obtenue par vidange du fût médullaire fémoral (« flush-out ») étaient conformes aux données publiées relatives au contenu de la moelle osseuse du rat [177]. Ces données ont permis de valider ce modèle d'autogreffe interindividuelle de moelle osseuse. L'unidose de 15 Gy qui a été délivrée correspond à l'équivalent biologique de séquelles d'irradiation à 60 Gy, délivrés de façon fractionnée. Soixante grays est la dose habituellement utilisée pour le traitement des carcinomes épidermoïdes des VADS chez l'homme. Le choix d'une irradiation en unidose a permis de limiter les fractionnements et donc le nombre d'anesthésies des animaux. La majorité des complications liées à la radiothérapie des VADS se produisent au

niveau de la mandibule (ostéoradionécrose mandibulaire) [172]. Cependant, le choix du site d'irradiation au niveau de la mandibule n'a pas pu être retenu. En effet, une irradiation cervico-céphalique à un équivalent biologique de 60 Gy était incompatible avec la survie des animaux (les animaux ne peuvent survivre à une irradiation de leur système nerveux central dépassant l'équivalent biologique de 40 Gy) [33]. La petite taille des animaux n'a pas permis de concevoir une méthode de radioprotection encéphalique et médullaire suffisamment fiable. Le choix du site d'irradiation retenu a donc été les membres inférieurs des animaux. L'irradiation des animaux n'a donné lieu à aucune complication majeure. Les incidents survenus étaient ceux habituellement rencontrés avec ce type d'irradiation localisée.

En territoire non irradié et non implanté, une néoformation osseuse s'est produite à l'intérieur des défauts osseux créés ainsi qu'entre les berges des corticales osseuses. Ces capacités de cicatrisation osseuse spontanées sont bien connues et reportées dans de précédentes études, notamment chez le rat Wistar [175]. Concernant les défauts osseux irradiés et non implantés, les résultats histologiques (microscopie optique et microscopie électronique à balayage) ont mis en évidence l'absence de cicatrisation et de néoformation osseuses. Ces résultats sont également parfaitement établis et illustrés par une étude d'Arnold et Coll. sur l'os irradié chez le rat [57]. La réparation osseuse spontanée est en effet largement compromise et réduite dans des aires préalablement irradiées et la physiologie de la réparation osseuse est altérée après traitement par radiothérapie [33,46,64,130]. Les radiations ionisantes retardent la consolidation d'une fracture, augmentent l'incidence d'unions fibreuses [64], sont à l'origine d'ostéoradionécroses [172] et réduisent la qualité des greffes osseuses [7]. Les altérations de la réparation de l'os irradié sont liées aux effets cellulaires des radiations ionisantes ; les ostéoblastes et ostéoclastes sont quantitativement diminués avec la radiothérapie [46,171] ; la différenciation terminale des ostéoblastes est, quant à elle, accélérée [171]. Le stroma médullaire est également altéré par les radiations ionisantes [48]. Enfin, les tissus vasculaires sont altérés, en particulier les capillaires [55].

Les techniques de reconstruction osseuse peuvent recourir aux greffes osseuses ou à l'utilisation de substituts osseux. Dans le cadre de la reconstruction chez des patients atteints d'un cancer des VADS, les greffes osseuses libres mènent à une morbidité augmentée et ne peuvent pas être réalisées lorsque la qualité des vaisseaux est altérée [7,9]. Les céramiques de phosphate de calcium, utilisées sous forme de granules ou de bloc, apparaissent depuis de nombreuses années comme une alternative appropriée aux greffes osseuses [15]. Cependant, ces céramiques ne viennent pas réellement en contact avec la surface osseuse. Pour

contrecarrer cet inconvénient, des substituts osseux injectables sont développés pour entrer parfaitement au contact de la surface osseuse ; par ailleurs, ils permettent une chirurgie moins invasive [105].

Dans cette étude, l'IBS a été utilisé pour ses propriétés ostéoconductrices déjà reportées dans différents modèles animaux [104]. Les granules de BCP ont parfois été retrouvés en dehors des défauts créés et implantés. L'IBS est un biomatériau qui ne durcit pas après injection [105]. Gautier et Coll. ont ainsi reporté l'utilisation de « bouchon » de BCP macroporeux pour fermer la cavité et maintenir ce matériau injectable en place chez le lapin [106,107]. La néoformation osseuse observée dans l'os non irradié témoigne des propriétés ostéoconductrices de l'IBS, résultats déjà publiés dans de précédentes études [106,107]. Le polymère hydrosoluble (HPMC) situé entre les granules de BCP semble présenter un effet « porteur » ; il préserve les espaces entre les granules pour permettre l'angiogénèse et l'ostéoconduction [105,110]. Les résultats obtenus avec l'utilisation d'IBS dans les aires préalablement irradiées montrent que ce biomatériau est bien toléré, aucune lyse osseuse périphérique ni ostéoradionécrose n'ont été observées ; l'intégration du biomatériau (utilisé sans moelle osseuse) s'est produite sous la forme d'une sorte d'intégration fibreuse dans ces aires irradiées. Cependant, l'IBS implanté seul n'a pas pu réparer à lui seul un défaut osseux irradié, il n'y a pas ou peu de néoformation osseuse observée. Ce même matériau utilisé pour la réparation osseuse d'un défaut osseux dans des conditions extrêmes de rat âgé et présentant une sévère ostéopénie n'a pas non plus permis de reconstruction osseuse de qualité [179]. Peu d'études ont été conduites sur l'utilisation d'un biomatériau avant irradiation. Certains auteurs ont rapporté que les céramiques de phosphate de calcium ne compromettraient pas les effets thérapeutiques des radiations ionisantes [17,113]. Dans une précédente expérimentation, Malard et Coll. avaient montré que les radiations ionisantes ne produisaient pas d'effet négatif sur les capacités d'ostéointégration des biomatériaux de phosphate de calcium mais qu'elles réduisaient leurs propriétés ostéoconductrices [20]. Dans un os irradié, il semblerait que les cellules ostéogéniques ainsi que le contact précoce entre les cellules osseuses et le biomatériau soient déficients. Des études publiées montrent que les greffes de moelle osseuse apportent des cellules ostéoprogénitrices [123] et que les cellules souches de moelle osseuse sont quantitativement diminuées par les radiations ionisantes [51] ; ainsi, les résultats de la présente étude pourraient être expliqués par la déplétion en cellules souches de moelle osseuse dans un os préalablement irradié.

De nouvelles technologies sont développées pour la réparation et la reconstruction osseuses ; elles sont basées sur l'utilisation de biocéramique poreuses, sorte « d'échafaudage », associées à des cellules de moelle osseuse [118]. De précédentes études ont montré que les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) dérivant de la moelle osseuse pouvaient être cultivées sur les biomatériaux ; elles conduisent à une différenciation ostéoblastique sous conditions ostéogéniques et procurent des propriétés ostéoconductrices aux biomatériaux après implantation *in vivo* [52,152]. Certains auteurs utilisent plutôt des cellules souches mésenchymateuses que l'ensemble de la moelle osseuse (ou moelle totale) [52,152]. Dans notre étude, le choix d'une greffe de moelle totale fraîche a été effectué pour permettre une greffe extemporanée. De plus, la moelle osseuse totale comporte une proportion importante de facteurs de croissance ainsi qu'une large variété de populations cellulaires, notamment les cellules souches mésenchymateuses à l'origine des ostéoblastes et les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) à l'origine des ostéoclastes [52]. Les CSMs et les CSHs sont impliquées dans l'homéostasie osseuse et dans le renouvellement des cellules sanguines périphériques matures [52]. Dans la présente étude, les défauts osseux créés étaient en communication directe avec la cavité médullaire de l'os ; les résultats suggèrent que la moelle osseuse et les cellules ostéogéniques sont déjà suffisamment présentes dans les défauts osseux non irradiés pour permettre la réparation osseuse.

En territoire préalablement irradié, les greffes de moelle osseuse permettent une augmentation significative de la croissance osseuse contrairement aux territoires osseux non irradiés. Ces résultats suggèrent que les effets des radiations ionisantes sur la moelle osseuse jouent un rôle clef dans la réparation osseuse et que la qualité et/ou la quantité de moelle osseuse diminue après une radiothérapie. Par ailleurs, certains auteurs ont également démontré que les CSMs issues de la moelle osseuse pouvaient s'orienter vers un phénotype de cellules endothéliales et favoriser ainsi la néovascularisation [147-149]. Ces effets pourraient expliquer le manque de croissance osseuse dans les défauts irradiés implantés avec de l'IBS seul. Les résultats obtenus avec l'association moelle osseuse et IBS en territoire irradié suggèrent que les greffes de moelle osseuse agissent de façon notable sur la réparation osseuse et apportent des cellules fonctionnelles pour cette réparation. Les greffes de moelle osseuse sont dans le même temps accompagnées par une augmentation significative de la résorption de granules de BCP ; cette augmentation nous amène à penser que les greffes de moelle osseuse produisent également des cellules fonctionnelles pour la dégradation de la céramique. Cependant, l'effet additif de l'association IBS et greffe de moelle osseuse sur la

croissance osseuse n'a pas été obtenue, contrairement à une précédente étude utilisant des granules de BCP [19,169]. La mise en place de la greffe de moelle osseuse au sein du défaut osseux était différente : la greffe de moelle osseuse était mélangée à l'IBS dans un tube à essai hépariné, puis l'ensemble était placé *in situ* ; dans l'étude de Malard et Coll., la greffe de moelle osseuse était placée directement au sein des défauts osseux préalablement remplis de granules de BCP. Or, certains auteurs ont montré que l'association *in vitro* de cellules directement sur le biomatériau BCP, sans imprégnation préalable de celui-ci, entraînait une cytotoxicité [180]. Nous n'avons pas étudié la viabilité des cellules à l'intérieur du tube hépariné : un certain nombre de cellules y survit puisqu'il y a une dégradation significative du biomatériau, mais quel est le pourcentage et quelles sont ces cellules (ce ne sont pas les mêmes cellules qui agissent sur la repousse osseuse et sur la dégradation du biomatériau) ? Dans l'étude de Malard et Coll., les cellules de la greffe de moelle osseuse présentent également un contact précoce avec la périphérie du défaut osseux contrairement à notre étude, contact qui pourrait être favorable à la néoformation osseuse.

Cette étude ne fournit pas d'information sur les mécanismes impliqués dans la réparation osseuse (recrutement d'ostéoprogéniteurs, néoangiogénèse, ...). La physiologie de la réparation osseuse est complexe, de nombreux facteurs de croissance sont nécessaires [181]. Il a été démontré que les radiations ionisantes induisaient une diminution dose dépendante de la production de TGF- $\beta$ 1 et de VEGF [46]. Le rôle joué par les facteurs de croissance de la moelle osseuse semble être également une « piste » intéressante à suivre pour étudier la réparation et la reconstruction osseuse en territoire irradié.



## 5. CONCLUSION

---

L'étude de comblements osseux par un substitut osseux injectable effectuée dans un territoire préalablement irradié n'avait jusqu'alors jamais été menée à des doses de radiations ionisantes adaptées au traitement des carcinomes. Le modèle utilisé dans cette étude a permis d'envisager l'allogreffe de moelle osseuse grâce à l'utilisation d'un modèle animal consanguin adapté à l'obtention de moelle osseuse en quantité et qualité suffisantes et permettant d'éviter tout rejet.

Ainsi, ce modèle animal expérimental a été ainsi parfaitement adapté pour simuler des séquelles d'irradiation osseuse à doses thérapeutiques et pour permettre la réalisation de défauts osseux et l'implantation de biomatériau associé à une greffe de moelle osseuse totale.

Cette étude confirme que l'IBS présente d'excellentes propriétés ostéoconductrices mais uniquement en territoire non irradié. Les résultats obtenus montrent que l'implantation de substituts osseux seuls au sein de pertes de substances effectuées en tissu irradié n'est pas suffisante pour augmenter significativement la quantité d'os néoformé. En territoire préalablement irradié, cette étude montre la nécessité et l'efficacité remarquables de l'utilisation de greffe de moelle osseuse totale pour permettre une reconstruction osseuse. L'association d'une greffe de moelle osseuse totale au biomatériau en territoire irradié permet en effet l'obtention d'une néoformation osseuse équivalente à celle obtenue en territoire non irradié implanté avec de l'IBS seul. L'utilisation d'IBS seul est parfaitement tolérée mais ne permet pas de reconstruction osseuse. Dans ce cadre, l'utilisation du biomatériau associé à une greffe de moelle osseuse sert de support adéquat et permet d'optimiser la néoformation osseuse.

Le recours à une greffe de moelle osseuse totale présente l'avantage de pouvoir être réalisé de façon extemporanée ; néanmoins, le nombre de cellules souches mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse totale est très faible (environ 1/10 000 à 1/100 000 cellules nucléées). La reconstruction osseuse en sélectionnant ces cellules et en les multipliant pour les associer ensuite à un biomatériau est une voie de recherche séduisante qui a ainsi été évaluée dans la dernière partie de ce travail.



#### **IV. QUATRIEME PARTIE :**

**ETUDE DE L'ASSOCIATION BCP - MO TOTALE VERSUS  
BCP - MO CSMs ET BCP - AT CSMs IMPLANTEES EN  
SITE OSSEUX APRES IRRADIATION**

## 1. CONTEXTE D'ETUDE

---

L'étude de l'association d'une céramique phosphocalcique à une greffe de moelle osseuse totale ou à des CSMs issues de moelle osseuse ou de tissu adipeux comme matériau de substitution pour la reconstruction osseuse d'une perte de substance en territoire irradié s'intègre dans la suite logique des travaux réalisés dans l'étude précédente.

L'association de moelle osseuse totale aux céramiques phosphocalciques, sous forme de granules [19] ou sous forme injectable [182], a permis d'améliorer significativement la repousse osseuse obtenue après implantation en territoire irradié.

La réparation de tout défaut osseux nécessite le recrutement et la prolifération notamment de CSMs, possédant des capacités de différenciation ostéoblastique, présentes au sein de la moelle osseuse totale, mais diminuées après une irradiation [178], d'où l'intérêt de les sélectionner et de les amplifier.

Le nombre de CSMs contenues dans la moelle osseuse totale est très faible, une CSM pour 10 000 à 100 000 cellules mononucléées [122,123]. Logiquement, la culture *in vitro* de CSMs issues de moelle osseuse totale puis leur association à divers biomatériaux ont été proposées et évaluées par de nombreux auteurs [154-156,158,159]. Néanmoins, aucune étude n'a pour l'instant été menée quant à leur efficacité en territoire irradié.

La propriété de différenciation ostéoblastique des CSMs issues de la moelle osseuse totale est une donnée acquise depuis de nombreuses années [138,139]. Cette même propriété des CSMs issues du tissu adipeux a également été démontrée, plus récemment [140,141]. L'obtention de tissu adipeux humain est plus aisée que l'obtention de moelle osseuse et la quantité disponible plus importante.

Dans ce contexte, le but de ce travail a été l'évaluation de l'association de moelle osseuse totale ou de CSMs issues soit de la moelle osseuse soit du tissu adipeux à des granules de

BCP pour la reconstruction osseuse en territoire irradié. Jusqu'à ce jour, de plus en plus d'études font état de ces associations, mais jamais en territoire irradié.

Le même modèle de rat consanguin porteur de séquelles d'irradiation osseuse que dans l'étude précédente a été utilisé.

## 2. MATERIEL ET METHODES

---

### 2.1. Etude *in vitro*

#### 2.1.1. Animaux

Cette étude *in vitro* a été effectuée afin d'évaluer nos techniques de prélèvements et de contrôler la différenciation ostéoblastique de nos cellules.

Un rat consanguin de souche Lewis A1-haplotype RT1<sup>a</sup> (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France) a été utilisé. L'animal, âgé de 8 semaines et d'un poids  $\geq 225$  grammes, a été acclimaté pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. L'ensemble de l'expérimentation animale a été mené au sein de l'Unité Thérapeutique Expérimentale de l'Institut Fédératif de Recherche 26 à la Faculté de Médecine de Nantes (UTE, IFR 26, Nantes, France).

Le rat a été placé dans une cage standard dans un local à température constante de 21°C et soumis à des cycles de 12/12h d'éclairage-obscurité. L'animal a été alimenté avec une nourriture de laboratoire standard et a reçu de l'eau *ad libitum*.

La stabulation du rat et l'expérimentation ont été conduites dans le respect de la directive européenne réglementant la conduite des expérimentations animales (directive européenne n°86/609/CEE).

#### 2.1.2. Etude de la moelle osseuse

- **Prélèvement de moelle osseuse**

Le prélèvement des deux fémurs a été effectué sous anesthésie générale de la même façon que dans la deuxième étude. Chaque fémur a ensuite été placé dans un tube stérile contenant 15 ml de milieu de transport (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + 1% Pénicilline G/Streptomycine (P/S) + 10% Sérum de Veau Fœtal (SVF)) (Annexe N°4).

Le prélèvement de moelle osseuse a été effectué en condition d'asepsie chirurgicale sous hôte par instillation de 1 ml de sérum physiologique dans l'extrémité proximale du fût médullaire de chaque fémur. Le recueil a été effectué dans un tube de 50 ml (Corning®),

Corning Incorporated, NY-USA) sur lequel a été placé un tamis cellulaire stérile avec une porosité de 70  $\mu\text{m}$  (Falcon, Bioscience, Belford). Les quelques microlitres restant suspendus au tamis ont été récupérés à l'aide d'une micropipette P200. Le recueil des 2 fémurs a été réalisé dans le même tube de 50 ml.

Le comptage des cellules et la mise en culture ont été effectués selon la séquence suivante :

- centrifugation de la suspension monocellulaire (1200 rpm, 8 minutes et rotor 11133),
- récupération du milieu de culture surnageant sous hôte,
- mise de 20 ml d'un nouveau milieu de culture complet N°1 (DMEM, 10% SVF, 1% P/S, 1% L-Glutamine (L-glut)) (Annexe N°4) dans le même flacon stérile et homogénéisation,
- comptage des cellules au bleu trypan sur cellule de Malassez,
- répétition du comptage 3 fois sur des prélèvements indépendants,
- mise en place des 20 ml de la solution de culture et des cellules dans une Flasque stérile F75 (Corning®, Corning Incorporated, NY-USA).

#### • Culture et caractérisation de la moelle osseuse

Les cellules issues de la moelle osseuse ont été placées dans un incubateur à 37 degrés Celsius et à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture complet a été changé tous les deux jours. Après 13 jours de mise en culture, le nombre total de cellules adhérentes a été calculé.

Ces cellules ont ensuite étéensemencées afin de réaliser une coloration rouge alizarine (Annexe N°6). Cette coloration permet de colorer en rouge la matrice extra-cellulaire minéralisée en rouge. Les cellules de la Flasque F75 ont ainsi étéensemencées dans 2 plaques de 6 puits (Corning BV, Schiphol-Rijk, The Netherlands). Le milieu ostéogénique utilisé était constitué du milieu de culture complet associé à 10 mM de  $\beta$ -Glycérophosphate, 50  $\mu\text{M}$  d'Acide ascorbique et 0,01  $\mu\text{M}$  de Vitamine D (Annexe N°5). La coloration rouge alizarine a été effectuée à J15 et J30.

### **2.1.3. Etude du tissu adipeux**

- **Prélèvement du tissu adipeux**

Le prélèvement de tissu adipeux a été effectué sous anesthésie générale sur le même rat que pour le prélèvement de moelle osseuse. Ce prélèvement a été réalisé au niveau épидидymaire, abdominal, mésentérique et rétro-péritonéal en condition d'asepsie chirurgicale. Les tissus adipeux épидидymaire et abdominal ont ensuite été placés dans un tube stérile contenant 20 ml de milieu de transport (DMEM + 1% P/S + 10% SVF), les tissus adipeux mésentérique et rétro-péritonéal ont été placés dans un second tube stérile contenant le même milieu de transport.

L'isolement des cellules stromales à partir des tissus adipeux obtenus a été réalisé sous hôte et est reporté en Annexe N°7.

Le comptage des cellules et la mise en culture ont été effectués de la même façon que pour les cellules issues de la moelle osseuse.

- **Culture et caractérisation du tissu adipeux**

Les cellules issues des différents tissus adipeux ont été placées dans des flasques F75 en séparant les tissus adipeux épидидymaire et abdominal des tissus adipeux mésentérique et rétro-péritonéal. Ces flasques ont été placées dans un incubateur à 37 degrés Celsius et à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture complet a été changé tous les deux jours. Après 5 jours de mise en culture, le nombre total de cellules adhérentes a été calculé.

Puis, ces cellules ont étéensemencées afin de réaliser une coloration rouge alizarine (de la même façon que pour les cellules issues de la moelle osseuse). La coloration rouge alizarine a été effectuée à J10, J21 et J30.



## **2.2. Etude *in vivo***

### **2.2.1. Préparation et caractérisation du matériau**

#### **2.2.1.1. Synthèse du BCP**

Le matériau de substitution osseuse utilisé dans cette étude était un phosphate de calcium biphasé macroporeux commercialisé (MBCP™) fourni sous la forme de granules par la société Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France).

#### **2.2.1.2. Composition**

Ce matériau a été caractérisé par diffraction de rayons X, spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, analyse de la porosité et analyse granulométrique en MEB.

Le biomatériau utilisé dans cette étude a été caractérisé lors de précédentes études effectuées au sein de notre laboratoire [19,169,183].

#### **2.2.1.3. Stérilisation du BCP**

Le biomatériau a été conditionné 24 heures avant l'implantation dans des tubes Ependorf emballés en sachet hermétiquement clos. Le matériau contenu dans ces tubes a été stérilisé pendant 20 minutes à 121°C dans un autoclave (Alphaklave 23, Taillis, France).

Un tube Ependorf a été préparé pour chaque implant, comportant une quantité identique de matériau.

### **2.2.2. Animaux**

Quatorze rats consanguins de souche Lewis A1-haplo type RT1<sup>a</sup> (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France) ont été utilisés. Les animaux, âgés de 8 semaines et d'un poids  $\geq 225$  grammes, ont été acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. L'ensemble de l'expérimentation animale a été mené au sein de l'Unité Thérapeutique Expérimentale de l'Institut Fédératif de Recherche 26 à la Faculté de Médecine de Nantes (UTE, IFR 26, Nantes, France).

Les rats ont été placés dans des cages standard dans un local à température constante de 21°C et soumis à des cycles de 12/12h d'éclairage-obscurité. Les animaux ont été alimentés avec une nourriture de laboratoire standard et ont reçu de l'eau *ad libitum*.

La stabulation des rats et l'expérimentation ont été conduites dans le respect de la directive européenne réglementant la conduite des expérimentations animales (directive européenne n°86/609/CEE).

### **2.2.3. Expérimentation**

#### **2.2.3.1. Séparation des animaux**

Les animaux ont été séparés en deux groupes (Tableau N°XXI) :

- Groupe N°1 : 12 rats irradiés,
- Groupe N°2 : 2 rats donneurs de moelle osseuse et de tissu adipeux :
  - Rat a : rat donneur de moelle osseuse et de tissu adipeux pour culture cellulaire de CSMs,
  - Rat b : rat donneur de moelle osseuse totale.

## **2.2.3.2. Procédure d'irradiation**

### **2.2.3.2.1. Généralités**

L'irradiation externe des animaux a été effectuée au laboratoire U601 (CHU Hôtel Dieu, Nantes, France). L'irradiateur utilisé était un Faxitron X-Ray (Faxitron X-Ray Corporation, Wheeling Illinois, USA) émettant des rayons X d'énergie de 160 kV (Figure N°18A).

### **2.2.3.2.2. Réalisation pratique**

L'irradiation externe a concerné les animaux du groupe N°1. Elle a été réalisée à J0, sous anesthésie générale. Les rats ont été endormis à l'UTE selon le même protocole que pour les expérimentations précédentes, puis transportés dans des cages à filtre au laboratoire U601 pour irradiation.

Les rats ont été placés par 2 dans l'irradiateur (Figure N°18B). Le maintien et la radioprotection des rats été assuré grâce à un système en plomb en forme de U, fabriqué sur mesure pour cette irradiation. Le système réalisé mesurait 200 x 170 mm pour une épaisseur de 6 mm. L'épaisseur nécessaire a été déterminée par le service de biophysique du CRLCC. Le champ d'irradiation a été limité aux membres inférieurs épargnant le pelvis des rats. Les paramètres de tension et d'intensité étaient des paramètres prédéfinis et préréglés à 160 kV et 6,3 mA. Un filtre de Cuivre de 0,5 mm a également été utilisé pour cette irradiation afin de ne pas brûler la peau des animaux. Les rats ont été placés sur le plateau N°7 (à chaque hauteur correspond une largeur de cône d'irradiation). La dose d'irradiation souhaitée était de 20 Gy pour les 12 rats. Elle a été délivrée selon un fractionnement d'une unidose de 20 Gy. L'exposition nécessaire pour l'obtention de cette dose a été calculée à 31,25 minutes, le débit de dose étant de 0,64 Gy/min à cette hauteur (Figure N°18C).



**A**



**B**



**C**

**Figures N°18 : irradiation des rats**

**A – Irradiateur Faxitron X-Ray, laboratoire U601, Nantes, France**

**B – Fenêtre d’observation**

**C - Mise en place des animaux et limites du champ d’irradiation aux membres inférieurs. Le reste du corps est protégé par des atténuateurs en Plomb**

### **2.2.3.3. Procédure chirurgicale et implantation**

#### **2.2.3.3.1. Généralités et répartition des implants**

La réalisation de défauts osseux et l'implantation ont été effectuées trois semaines après l'irradiation (J21). Elles ont concerné tous les rats du groupe N°1.

Quatre conditions d'implantation ont été évaluées : défauts osseux comblés par des granules de BCP seuls, ou associés soit à de la moelle osseuse totale (MOT), soit à des Cellules Souches Mésoenchymateuses issues de la moelle osseuse (MO CSMs), soit à des Cellules Souches Mésoenchymateuses issues de tissu adipeux (AT CSMs). Les comblements ont été effectués jusqu'à la corticale externe opposée au défaut osseux créé.

Le rat a du groupe N°2, non irradié et non implanté, a été utilisé pour l'obtention de moelle osseuse totale nécessaire aux comblements par la MOT de façon extemporanée. La nature de la MOT a été vérifiée par un myélogramme et une numération médullaire.

Le rat b du groupe N°2, non irradié et non implanté, a été utilisé :

- pour l'obtention de moelle osseuse totale nécessaire pour l'obtention de MO CSMs et leur culture,
- pour l'obtention de tissu adipeux nécessaire pour l'obtention d'AT CSMs et leur culture,

La répartition des animaux et des comblements est rapportée dans le Tableau N°XXI.

Groupe N°	Rat N°	Irradiation	Implantation			
			Fémur droit	Tibia droit	Fémur gauche	Tibia gauche
1	1	20 Gy	BCP seul	BCP seul	BCP+MOT	BCP+MOT
	2	20 Gy	BCP seul	BCP seul	BCP+MOT	BCP+MOT
	3	20 Gy	BCP seul	BCP seul	BCP+MOT	BCP+MOT
	4	20 Gy	BCP+MOT	BCP+MOT	BCP seul	BCP seul
	5	20 Gy	BCP+MOT	BCP+MOT	BCP seul	BCP seul
	6	20 Gy	BCP+MOT	BCP+MOT	BCP seul	BCP seul
	7	20 Gy	BCP+MO CSM	BCP+MO CSM	BCP+AT CSM	BCP+AT CSM
	8	20 Gy	BCP+MO CSM	BCP+MO CSM	BCP+AT CSM	BCP+AT CSM
	9	20 Gy	BCP+MO CSM	BCP+MO CSM	BCP+AT CSM	BCP+AT CSM
	10	20 Gy	BCP+AT CSM	BCP+AT CSM	BCP+MO CSM	BCP+MO CSM
	11	20 Gy	BCP+AT CSM	BCP+AT CSM	BCP+MO CSM	BCP+MO CSM
	12	20 Gy	BCP+AT CSM	BCP+AT CSM	BCP+MO CSM	BCP+MO CSM
2	a	Non irradié	Donneur de MOT			
	b	Non irradié	Donneur de MO CSM et d'AT CSM			

**Tableau N°XXI : répartition des animaux et des sites d'implantation**

#### 2.2.3.3.2. Création des défauts osseux et implantation

Trois semaines après l'irradiation (J21), la procédure chirurgicale de création d'une perte de substance osseuse a été réalisée sur les animaux du groupe N°1. Cette procédure a été réalisée selon le même protocole opératoire que dans les études précédentes, sous anesthésie générale (Figure N°19A).

Les associations de sérum physiologique stérile, de MOT, de MO CSMs et d'AT CSMS aux granules de BCP ont été effectuées de façon concomitante à la réalisation du défaut osseux.

Chaque perte de substance osseuse a été comblée par des granules de BCP seuls, ou associés soit à de la MOT, soit aux MO CSMs, soit aux AT CSMS. La quantité de granules de BCP était la même dans chaque défaut osseux. Les MO CSMs et AT CSMS implantées ont été obtenues après 13 jours de culture.

- **Préparation des « matériaux de comblement » :**

- ***Comblement par granules de BCP seuls***

Pour chaque comblement, 20 µl de sérum physiologique stérile ont été mélangés aux granules de BCP dans le tube Ependorf à l'aide d'une micropipette, puis placés dans le défaut osseux (Figures N°19B et 19C).

- ***Comblement par granules de BCP associés à de la MOT***

Le prélèvement de MOT a été effectué sur le rat a du groupe N°2 spécialement désigné comme donneur de MOT. Le prélèvement de MO a été réalisé de la même façon que dans l'étude *in vitro* par instillation de 1 ml de sérum physiologique stérile dans chaque fémur. La

MOT issue des deux fémurs a été placée dans un tube hépariné Vénoject II (Terumo Europe, Louvain, Belgique).

Pour chaque comblement, 20 µl de MOT ont été mélangés aux granules de BCP dans le tube Ependorf, puis placés dans le défaut osseux ; 30 µl de MOT ont ensuite été rajoutés à l'aide d'une micropipette, afin d'obtenir une imprégnation complète, comme dans la deuxième étude [182]. Ainsi, chaque comblement de granules de BCP associés à la MOT a comporté 1/40 de la MOT issue des deux fémurs.

Le restant de MOT a été conservé pour effectuer :

- un comptage de la population cellulaire en présence de la même façon que dans l'étude *in vitro*. Les résultats ont été exprimés en nombre total de cellules à partir de deux fémurs.
- un étalement sur lame par frottis afin d'exécuter une étude cytologique du myélogramme permettant de connaître la formule médullaire (Dr Garand, laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, France). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules correspondant à chaque type cellulaire.

- ***Comblement par granules de BCP associés aux MO CSMs***

Le prélèvement de MOT a été effectué sur le rat b du groupe N°2 spécialement désigné comme donneur de CSMs issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux. Le prélèvement et le comptage des cellules ont été réalisés de la même façon que dans l'étude *in vitro*. Les cellules ont ensuite été mises en culture pendant 13 jours avant les implantations dans une Flasque stérile F75 comportant un milieu de culture complet N°2 (Alpha Modified Eagle's Medium (αMEM) + 1% L-glut + 1% P/S + 10% SVF) (Annexe N°4). Le jour de l'implantation, le nombre total de MO CSMs obtenues après 13 jours de culture a été calculé.



Pour chaque comblement, 20 µl de sérum physiologique associés aux MO CSMs ont été mélangés aux granules de BCP dans le tube Ependorf, puis placés dans le défaut osseux. Chaque comblement de granules de BCP associés aux MO CSMs comportait 1/40 des MO CSMs issues de deux fémurs après 13 jours de prolifération.

- ***Comblement par granules de BCP associés aux AT CSMs***

Le prélèvement de tissu adipeux a été effectué sur le rat b du groupe N°2 spécialement désigné comme donneur de CSMs issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux. Le tissu adipeux a été prélevé au niveau épидидymaire. Le prélèvement, le comptage des cellules et la mise en culture ont été réalisés de la même façon que dans l'étude *in vitro*, 13 jours avant les implantations. Le jour de l'implantation, le nombre total d'AT CSMs obtenues après 13 jours de culture a été calculé.

Pour chaque comblement, 20 µl de sérum physiologique associés aux AT CSMs ont été mélangés aux granules de BCP dans le tube Ependorf, puis placés dans le défaut osseux. L'ensemble des AT CSMs issues d'un animal après 13 jours de culture a été utilisé et réparti équitablement entre chaque défaut osseux.



A



B



C

**Figures N°19 : création des défauts osseux et implantation**

**A – Création des défauts osseux en condition d’asepsie chirurgicale**

**B – Implantation de granules de BCP seuls sur un tibia gauche**

**C – Aspect après implantation de granules de BCP seuls sur un tibia droit**

### 2.2.3.3.3. Stabulation

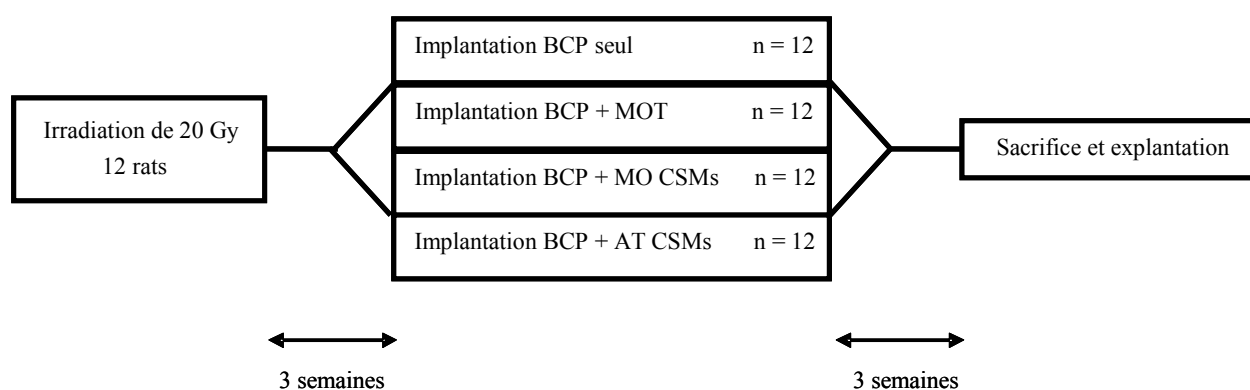
La stabulation des animaux a été identique à celle des études précédentes.

### 2.2.3.4. Euthanasie et prélèvement des échantillons

Les rats ont été euthanasiés de la même façon que dans les études précédentes, à 3 semaines de l'implantation (J42). Le prélèvement et la fixation des pièces osseuses ont également été réalisés de la même façon que dans les études précédentes.

### 2.2.3.5. Synthèse de l'expérimentation

La chronologie irradiation-implantation-explantation est rappelée dans la Figure N°20.



**Figure N°20 : résumé du déroulement chronologique de l'expérimentation**

## **2.2.4. Etude des explants**

### **2.2.4.1. Préparation des échantillons**

#### **2.2.4.1.1. Inclusion dans une résine de Glycol-Méthacrylate (GMA)**

- **Généralités**

Tous les prélèvements ont été inclus sans décalcification dans une résine de GMA (Annexe N°8) destinée à deux techniques différentes : colorations histo-morphométriques (Pentachrome de Movat et Trichrome de Goldner) et étude en MEB.

- **Technique d'inclusion**

Après une période de 72 heures, les 4 explants obtenus sur chacun des 12 animaux (48 échantillons) ont été préparés.

La déshydratation a été réalisée par passages successifs de 36 heures chacun dans 4 bains d'éthanol de degré croissant (70, 80, 95, puis 100°) à 4°C, puis dans l'acétone pur pendant 36 heures à 4°C.

Une résine GMA a été utilisée pour l'imprégnation des échantillons. L'imprégnation en résine GMA a été réalisée dans deux bains successifs pendant un total de 7 jours à -20°C. L'inclusion en résine GMA avec milieu initiateur a ensuite été réalisée pendant 72 heures à 4°C.

#### **2.2.4.1.2. Coupe des échantillons**

Les échantillons ont été poncés selon leur sens transversal à l'aide d'un ponceur Rotronic (Reitel, Bad Essen, Allemagne) de façon à obtenir des blocs centrés juste avant la zone implantée. Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome tissus durs (Reichert-Jung 2050, Nussloch, Allemagne) jusqu'au milieu de la zone implantée sur chaque échantillon. La partie résiduelle de l'échantillon a été utilisée pour l'analyse au MEB.

#### **2.2.4.2. Colorations et étude histologique**

L'étude histo-morphométrique a été réalisée sur microscope photonique après coloration des coupes de 7  $\mu\text{m}$  au Trichrome de Goldner (Annexe N°9) et Pentachrome de Movat (Annexe N°10).

Une fois colorées, les coupes ont été montées entre lames et lamelle avec une ou deux gouttes de toluène à l'aide d'une colle de montage Eukitt (Labo Nord, Villeneuve d'Asq, France) et ont été examinées au microscope photonique (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

#### **2.2.4.3. MEB, analyse d'image et analyse statistique**

- **Le polissage des échantillons**

Les surfaces des coupes résiduelles ont été polies à l'aide de disques abrasifs de rugosité décroissante (grains 800, 1200, 2500 et 4000) sur polisseuse Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff IL, USA).

- **La métallisation des échantillons**

La surface polie des blocs a été métallisée avec de l'or-palladium à l'aide d'un métalliseur (métalliseur Denton Vacuum Desk III, Moorestown, USA).

- **Acquisition des images et analyse d'image**

L'acquisition et l'analyse d'images ont été réalisées de la même façon que dans l'étude précédente à l'aide d'un MEB (Leo 1450 VP, Zeiss, Allemagne) et d'un logiciel d'analyse d'images (Leica microsystem imaging solution, Angleterre).

- **Paramètres mesurés**

L'étude en microscopie électronique à balayage a permis une observation qualitative ultra structurale des explants, en particulier de l'interface entre l'os néoformé et les granules de BCP. Une étude quantitative basée sur l'analyse d'image semi-automatisée a été menée pour quantifier la formation de l'os de repousse et la résorption des granules de BCP.

L'analyse d'image a permis de mesurer les mêmes paramètres que dans l'étude précédente :

- surface occupée par le biomatériau,
- surface occupée par l'os néoformé,
- surface occupée par les tissus non minéralisés,
- et surface totale analysée.

Ces valeurs, exprimées en unités de surface ( $\text{mm}^2$ ), ont ensuite été rapportées en pourcentage de la surface totale.

- **Analyse statistique**

Une analyse de variance (ANOVA) avec une comparaison multiple de moyennes (Bonferroni/Dunn) a été utilisée pour comparer la repousse osseuse en fonction des différentes conditions. Ce même test a été utilisé pour comparer la résorption des granules de BCP. Une différence a été considérée comme statistiquement significative pour une valeur p inférieure à 0,05.

## 3. RESULTATS

---

### 3.1. Etude *in vitro*

#### 3.1.1. Etude de la moelle osseuse

- **Prélèvement de moelle osseuse**

Le recueil de la moelle osseuse s'est révélé simple. La numération cytologique sur cellule de Malassez a montré que la population cellulaire totale dans 2 fémurs était constituée de  $146.10^6$  cellules mononucléées.

- **Nombre total de cellules adhérentes**

Les cellules n'arrivaient pas à confluence dans la Flasque F75. Le nombre total de cellules adhérentes à partir de 2 fémurs était de  $78.10^4$  après 13 jours de culture. La répartition des cellules a ainsi été de 65 000 cellules par puits.

- **Coloration rouge alizarine**

En raison de la faible prolifération des cellules adhérentes, la coloration rouge alizarine n'a été testée qu'à J30. Les résultats sont représentés dans la Figure N°21. A J30, les cellules issues de la moelle osseuse et cultivées en milieu ostéogénique ont synthétisé une matrice extra-cellulaire minéralisée. A J30, les cellules issues de la moelle osseuse et cultivées en milieu contrôle n'ont pas synthétisé de matrice extra-cellulaire minéralisée.

#### 3.1.2. Etude du tissu adipeux

- **Prélèvement du tissu adipeux**

Le recueil du tissu adipeux s'est révélé simple. Le tissu adipeux épидidymaire et abdominal prélevé présentait un poids total de 3,34 g ; le tissu adipeux mésentérique et rétro-péritonéal prélevé présentait un poids total de 1,81 g.

La numération cytologique sur cellule de Malassez a montré que la population cellulaire totale était constituée :

- de  $82,5 \cdot 10^6$  cellules mononucléées pour le tissu adipeux épидидymaire et abdominal prélevé,
- de  $34,9 \cdot 10^6$  cellules mononucléées pour le tissu adipeux mésentérique et rétro-péritonéal prélevé.

- **Nombre total de cellules adhérentes**

Les cellules étaient à confluence dans chaque Flasque F75 après quatre jours de culture.

Le nombre total de cellules adhérentes était :

- de  $2,88 \cdot 10^6$  après 5 jours de culture pour le tissu adipeux épидидymaire et abdominal,
- de  $4,32 \cdot 10^6$  après 5 jours de culture pour le tissu adipeux mésentérique et rétro-péritonéal.

Les cellules ont étéensemencées et leur répartition a ainsi été :

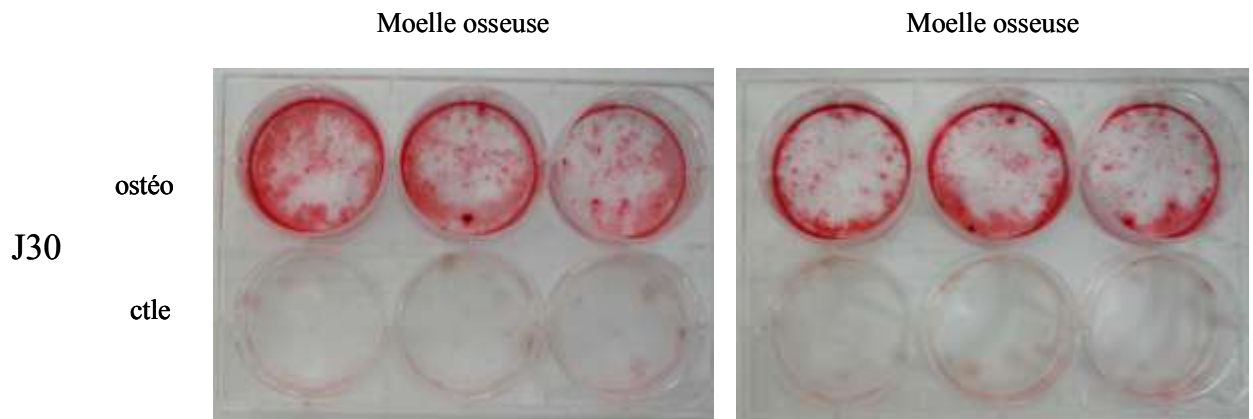
- de 5 760 cellules/cm<sup>2</sup> pour le tissu adipeux épидидymaire et abdominal,
- de 5 800 cellules/cm<sup>2</sup> pour le tissu adipeux mésentérique et rétro-péritonéal.

- **Coloration rouge alizarine**

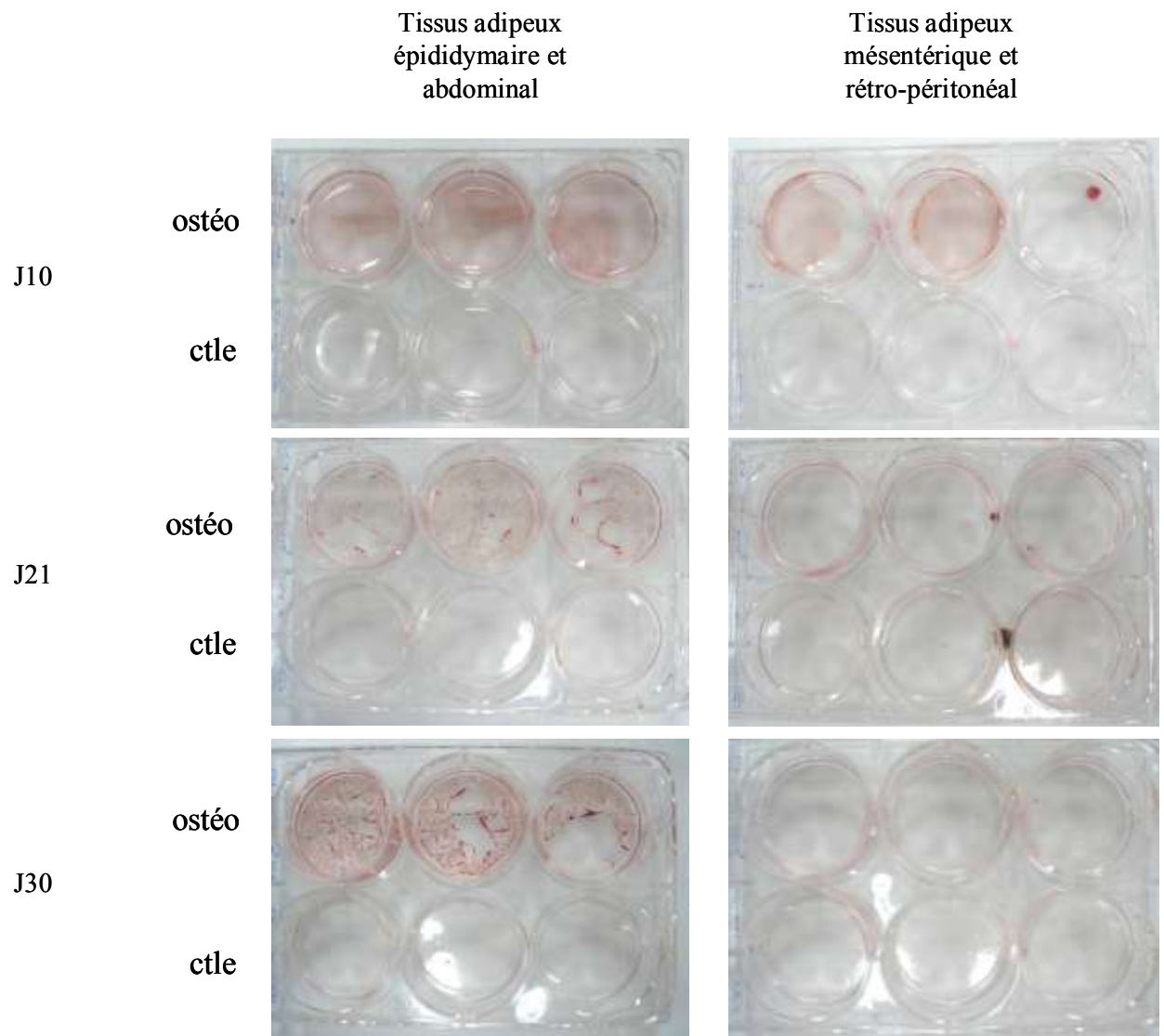
Les résultats sont représentés dans la Figure N°22.

- Les cellules issues du tissu adipeux épидидymaire et abdominal et cultivées en milieu ostéogénique ont synthétisé une matrice extra-cellulaire minéralisée. L'intensité de la coloration croît de J10 à J30. Les cellules issues du tissu adipeux épидидymaire et abdominal et cultivées en milieu contrôle n'ont pas synthétisé de matrice extra-cellulaire minéralisée, que ce soit à J10, J21, ou J30.
- Les cellules issues du tissu adipeux mésentérique et rétro-péritonéal et cultivées en milieu ostéogénique ont synthétisé une matrice extra-cellulaire minéralisée. L'intensité de la coloration est plus faible que pour le tissu adipeux épидидymaire et abdominal, en particulier à J30. Les cellules issues du tissu adipeux mésentérique et rétro-péritonéal et cultivées en milieu contrôle n'ont pas synthétisé de matrice extra-cellulaire minéralisée, que ce soit à J10, J21, ou J30.





**Figure N°21 : coloration rouge alizarine des cellules issues de la moelle osseuse à J30**



**Figure N°22 : coloration rouge alizarine des cellules issues des différents tissus adipeux**

## **3.2. Etude *in vivo***

### **3.2.1. Préparation et caractérisation du matériau**

L'analyse par diffraction des rayons X a montré que le biomatériau utilisé présentait un rapport HA/ $\beta$ TCP de 60/40, correspondant à un rapport Ca/P de 1,60. L'étude en spectrométrie infrarouge et en diffraction des rayons X a montré que le phosphate de calcium obtenu après frittage était un BPC, aucun carbonate n'ayant été détecté. La MEB couplée à l'analyse d'image semi-automatisée a montré que le MBCP implanté possédait une porosité globale de  $40 \pm 10,3\%$ . La MEB couplée à l'analyse d'image semi-automatisée a montré que le diamètre équivalent moyen des granules était de  $781 \pm 148,6 \mu\text{m}$  [19,169,183].

### **3.2.2. Expérimentation**

#### **3.2.2.1. Procédure d'anesthésie**

Durant l'irradiation des rates, une seule injection anesthésique a été nécessaire. Il n'y a pas eu de décès per- ou post-radique immédiat ni lié à l'anesthésie dans cette étude.

Durant la procédure chirurgicale, il y a eu à déplorer un décès peropératoire.

#### **3.2.2.2. Procédure d'irradiation**

La procédure d'irradiation externe s'est déroulée en elle-même sans difficulté particulière.

Un des rats a présenté une entérite radique, caractérisé par une diarrhée importante, sans doute liée à un mauvais positionnement du rat sous l'écran d'atténuation pendant l'irradiation.

Par ailleurs, la tolérance immédiate puis jusqu'à l'explantation a été bonne. Il n'y a pas eu d'incidents liés aux radiations ionisantes, en dehors des effets habituels (type radiodermite cutanée régressive). Aucun traitement spécifique n'a été nécessaire pour la prise en charge des effets secondaires de cette irradiation.

### 3.2.2.3. Procédure chirurgicale et implantation

#### 3.2.2.3.1. Création des défauts osseux et implantation

Durant la chirurgie, un décès peropératoire est survenu sur le rat présentant une entérite radique.

Au total, les défauts osseux ont été comblés :

- par des granules de BCP seuls (n = 12),
- par des granules de BCP associés à de la MOT (n = 12),
- par des granules de BCP associés aux MO CSMs (n = 10),
- par des granules de BCP associés aux AT CSMs (n = 10).

- **Préparation des « matériaux de comblement »**

- ***Comblement par granules de BCP seuls***

Les comblements par granules de BCP seuls se sont déroulés sans problème.

- ***Comblement par granules de BCP associés à de la MOT***

- Prélèvement de moelle osseuse

Le recueil de la moelle osseuse s'est révélé simple.

Les résultats montrent la conformité des myélogrammes de la moelle osseuse prélevée avec les données publiées [177]. La formule médullaire est rapportée dans le Tableau N°XXII.

La numération cytologique sur cellule de Malassez a montré que la population cellulaire totale dans 2 fémurs était constituée de  $112,05 \cdot 10^6$  cellules mononucléées.

- Nombre de cellules implantées

L'association de MOT aux granules de BCP et leur implantation se sont déroulées sans problème. Le nombre total de cellules implantées dans chaque défaut osseux était de  $2,8 \cdot 10^6$  cellules (1/40 de  $112,05 \cdot 10^6$  cellules).

- ***Comblement par granules de BCP associés aux MO CSMs***

- Prélèvement de moelle osseuse

La numération cytologique sur cellule de Malassez a montré que la population cellulaire totale dans 2 fémurs était constituée de  $111,36 \cdot 10^6$  cellules mononucléées.

- Nombre total de cellules adhérentes

Le nombre total de cellules adhérentes à partir de 2 fémurs était de  $6,24 \cdot 10^6$  après 13 jours de culture. Les cellules étaient à confluence dans la Flasque F75.

- Nombre de cellules implantées

Le nombre de cellules implantées dans chaque défaut osseux était de 156 000 MO CSMs (1/40 de  $6,24 \cdot 10^6$  cellules adhérentes).

- ***Comblement par granules de BCP associés aux AT CSMs***

- Prélèvement de tissu adipeux

Le recueil de tissu adipeux épидидymaire s'est révélé simple. La numération cytologique sur cellule de Malassez a montré que la population cellulaire totale était constituée de  $71 \cdot 10^6$  cellules mononucléées pour le tissu adipeux épидидymaire prélevé.

- Nombre total de cellules adhérentes

Les cellules étaient à confluence dans la Flasque F75 après 7 jours de culture. Le nombre total de cellules adhérentes était de  $5 \cdot 10^6$  après 13 jours de culture.

- Nombre de cellules implantées

Toutes les cellules adhérentes ont été implantées et réparties équitablement dans chaque défaut osseux. Ainsi, le nombre de cellules implantées dans chaque défaut osseux était de 500 000 AT CSMs ( $5.10^6$  cellules adhérentes).

MOELLE FEMORALE	Lignée granulocytaire					Lignée érythroblastique	Lignée Mégacaryocytaire	Lymphocytes	Plasmocytes	Monocytes
	Myéloblastes	Précurseurs granuleux neutrophiles	Polynucléaires							
			Neutrophiles	Eosinophiles	Basophiles					
%	6,5	16,5	31	1	0,5	2,5	+	29	0	13

**Tableau N°XXII : analyse cytologique du myélogramme de la moelle osseuse totale recueillie et implantée (résultats exprimés en pourcentage par type cellulaire)**

#### 3.2.2.3.2. Stabulation

Aucune infection n'a été constatée après la chirurgie des animaux. Il n'y a pas eu par ailleurs de manifestation de type Graft Versus Host Disease (GVHD) après la mise en place des greffes de moelle osseuse inter-individuelles, ni des cellules souches mésenchymateuses.

### **3.2.3. Etude des explants**

#### **3.2.3.1. Colorations et étude histologique**

Les observations histologiques ont été effectuées afin de déterminer les interactions entre l'os et le matériau et la morphologie de la néoformation osseuse. Une repousse osseuse a surtout été observée au sein des défauts osseux implantés avec des granules de BCP associés à une greffe de moelle osseuse totale.

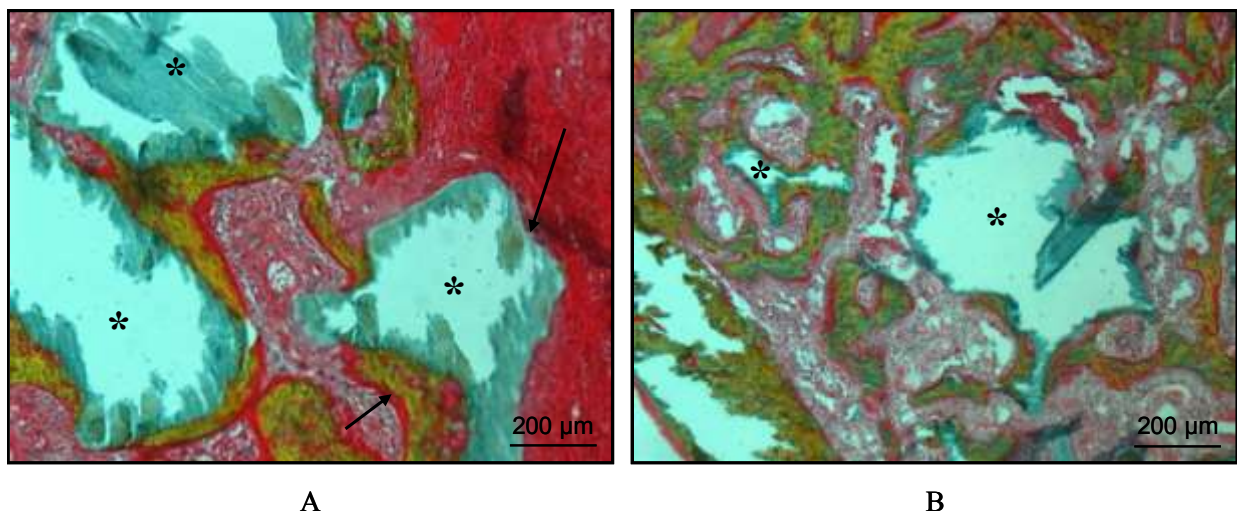
Dans le groupe témoin implanté avec des granules de BCP seuls, une bordure ostéoïde et un os de repousse jeune (os tissé) étaient parfois observés en petite quantité au contact des granules, témoignant d'un faible effet d'ostéoconduction du biomatériau. Cependant, le contact entre l'os de repousse et les granules de BCP était direct, sans interface fibreuse ni encapsulation. Un phénomène de fibrose pouvait dans certains cas également être observé entre les granules ou à leur contact (Figure N°23A).

Dans le groupe implanté avec des granules de BCP associés à une greffe de moelle osseuse totale, des travées osseuses issues de la profondeur de la perte de substance étaient nettement observées. Ces travées osseuses étaient beaucoup plus denses et plus nombreuses que dans le groupe implanté avec des granules de BCP seuls. Cette néoformation osseuse était mise en évidence à la périphérie des granules, à leur contact, mais également dans l'épaisseur des granules, dans les espaces macroporeux. La néoformation osseuse était visible sous la forme d'une apposition osseuse débutant sous une bordure ostéoïde, surtout visualisée par les colorations au Pentachrome de Movat. Des structures vasculaires étaient également observées sur diverses coupes et ainsi que la présence de moelle osseuse entre les travées osseuses néoformées (Figure N°23B).

Dans le groupe implanté avec des granules de BCP associés aux MO CSMs, une très faible néoformation osseuse était observée. Le plus souvent, un aspect de fibrose était observé au contact des granules de BCP ainsi qu'un aspect de cellules inflammatoires (Figure N°24A).

Dans le groupe implanté avec des granules de BCP associés aux AT CSMs, une très faible néoformation osseuse était également observée. Le plus souvent, un aspect de fibrose était observé au contact des granules de BCP et entre ces granules. Par ailleurs, des « espaces » constitués de lacunes visibles en microscopie étaient souvent présents entre la fibrose et les granules : ces espaces laissaient supposer la présence de tissu adipeux ou d'adipocytes au contact du biomatériau (Figure N°24B).

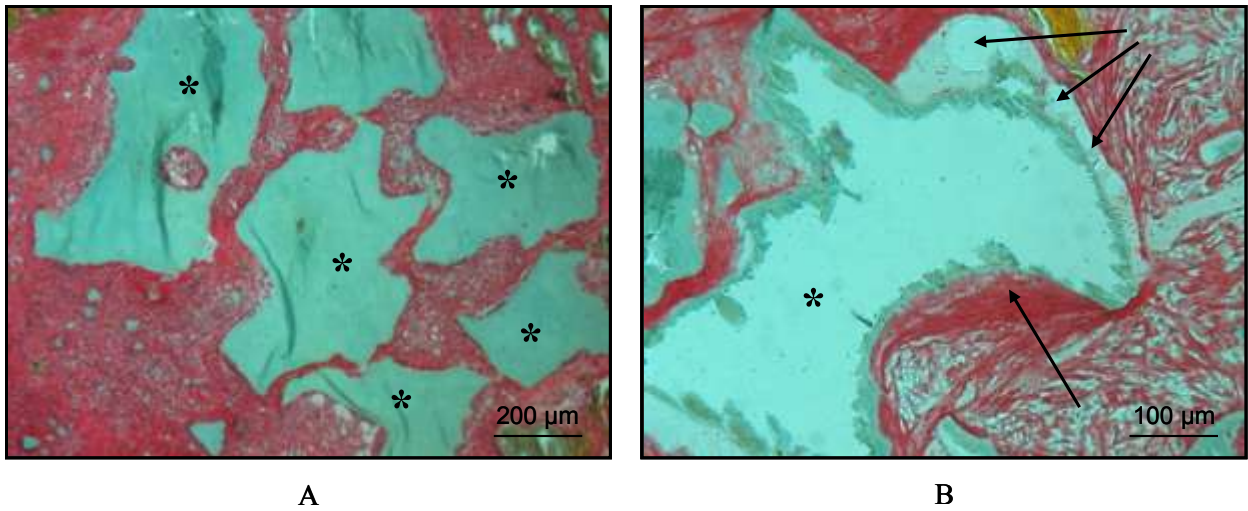
La résorption des granules de BCP pouvait également être observée sur les différentes coupes par des cellules multinucléées (Figures N°25A et N°25B).



**Figures N°23 : défauts osseux irradiés colorés au Pentachrome de Movat**

**A – Comblement par BCP seul : faible repousse osseuse et fibrose au contact du matériau (\*)**

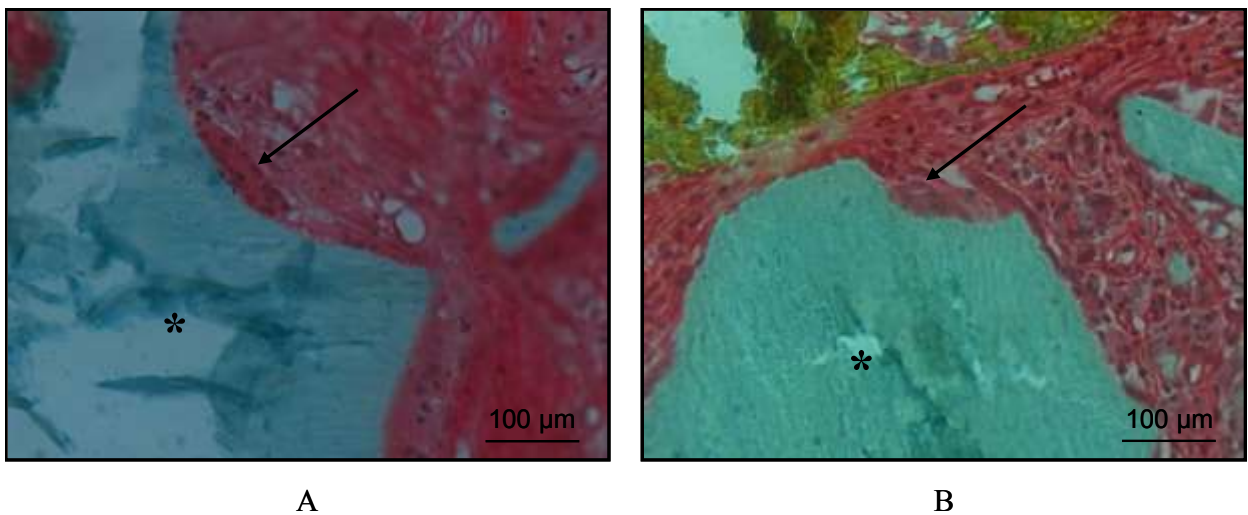
**B – Comblement par BCP - MOT : os néoformé au contact et entre les granules de BCP (\*), moelle osseuse entre les travées d'os néoformé**



**Figures N°24 : défauts osseux irradiés colorés au Pentachrome de Movat**

**A – Comblement par BCP - MO CSMs : fibrose et aspect de cellules inflammatoires au contact du matériau (\*)**

**B – Comblement par BCP - AT CSMs : fibrose et « lacunes adipocytaires » au contact du biomatériau (\*)**



**Figures N°25 : défauts osseux irradiés colorés au Pentachrome de Movat**

**A – Comblement par BCP seul : cellule multinucléée au contact du biomatériau (\*)**

**B – Comblement par BCP - MO CSMs : cellule multinucléée au contact du matériau (\*)**



### **3.2.3.2. MEB, analyse d'image et analyse statistique**

#### **3.2.3.2.1. Etude de la repousse osseuse**

- **Etude qualitative**

Les observations effectuées de l'interface os-matériau corroboraient les observations portées en microscopie photonique.

Seule une très faible néoformation osseuse a été observée au sein des défauts osseux irradiés et implantés avec des granules de BCP seuls (Figure N°26A).

Une néoformation osseuse centripète a été observée au sein des défauts osseux irradiés et implantés avec des granules de BCP associés à une greffe de MOT. Un contact intime a été observé entre les granules de BCP et l'os néoformé ; les observations ont montré que l'os néoformé était au contact des granules de BCP mais également dans les espaces inter-granulaires (Figure N°26B).

Seule une très faible néoformation osseuse a été observée au sein des défauts osseux irradiés et implantés avec des granules de BCP associés soit aux MO CSMs (Figure N°26D), soit aux AT CSMs (Figure N°26C).

- **Etude quantitative**

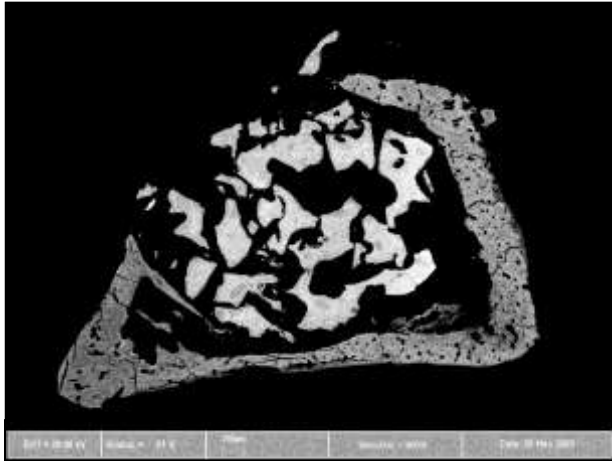
La quantité d'os néoformé était de  $9,10\% \pm 5,75$  après implantation de granules de BCP seuls en terrain irradié.

La quantité d'os néoformé était de  $16,56\% \pm 9,54$  après implantation de granules de BCP associés à une greffe de MOT en terrain irradié.

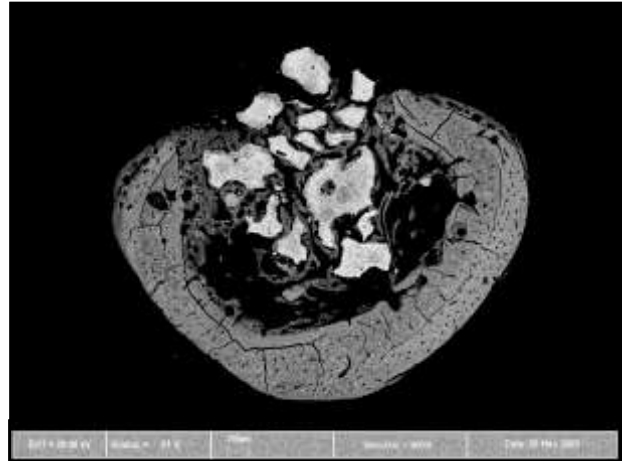
La quantité d'os néoformé était de  $6,26\% \pm 5,02$  après implantation de granules de BCP associés aux MO CSMs en terrain irradié.

La quantité d'os néoformé était de  $8,04\% \pm 12$  après implantation de granules de BCP associés aux AT CSMs en terrain irradié.

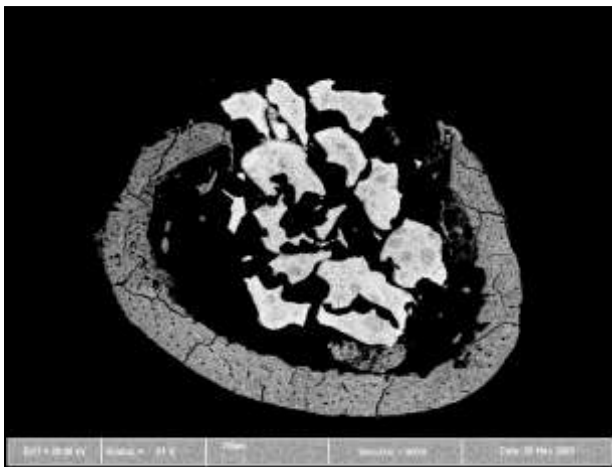
Les résultats quantitatifs et statistiques de la repousse osseuse sont rapportés dans le Tableau N°XXIII et la Figure N°27.



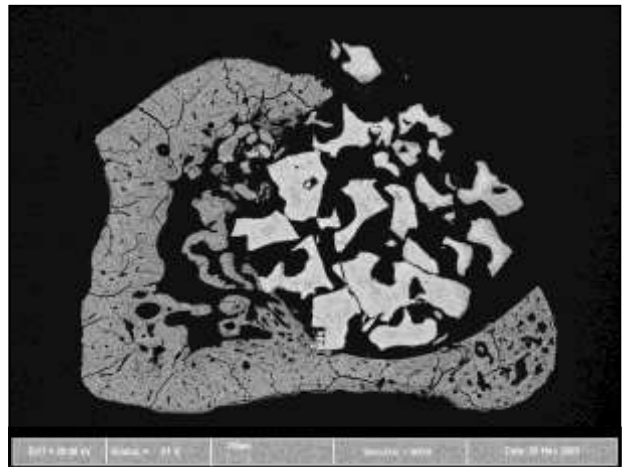
A



B



C



D

**Figures N°26 : défauts osseux en MEB (bar = 200  $\mu$ m)**

**A – Echantillon témoin comblé avec des granules de BCP seuls après irradiation préalable : absence de néoformation osseuse au sein de la perte de substance**

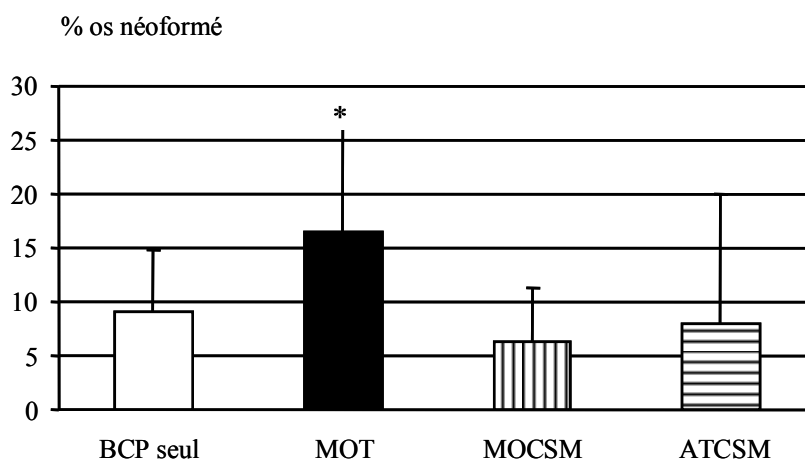
**B - Echantillon avec perte de substance implantée par des granules de BCP associés à une greffe de MOT après irradiation : la néoformation osseuse est plus abondante, un contact intime est observé entre l'os et les particules de BCP**

**C – Echantillon témoin comblé avec des granules de BCP associés aux AT CSMs après irradiation préalable : absence de néoformation osseuse au sein de la perte de substance**

**D – Echantillon témoin comblé avec des granules de BCP associés aux MO CSMs après irradiation préalable : faible néoformation osseuse au sein de la perte de substance**

	Valeur de p	
<b>BCP seul - BCP + MOT</b>	0,026	s
<b>BCP seul - BCP + MO CSM</b>	0,543	ns
<b>BCP seul - BCP + AT CSM</b>	0,919	ns
<b>BCP + MOT – BCP + MO CSM</b>	0,002	s
<b>BCP + MOT - BCP + AT CSM</b>	0,011	s
<b>BCP + MO CSM - BCP + AT CSM</b>	0,577	ns

**Tableau N°XXIII : résultats des tests statistiques de la repousse osseuse en fonction du type de comblement effectué**



**Figure N°27 : repousse osseuse exprimée en pourcentage d'os néoformé dans les défauts osseux irradiés (\* :  $p < 0,01$  versus BCP seul, AT CSM et MO CSM)**

La quantité d'os néoformé après implantation de granules de BCP associés à une greffe de MOT était significativement supérieure à celle obtenue après implantation de granules de BCP seuls ou après implantation d'une association de granules de BCP aux MO CSMs ou aux AT CSMs en terrain irradié.

### 3.2.3.2.2. Etude de la dégradation du matériau

- **Etude quantitative**

La quantité de granules de BCP restant était de  $25,05\% \pm 7,65$  après implantation de granules de BCP seuls en terrain irradié.

La quantité de granules de BCP restant était de  $23\% \pm 6,46$  après implantation de granules de BCP associés à une greffe de MOT en terrain irradié.

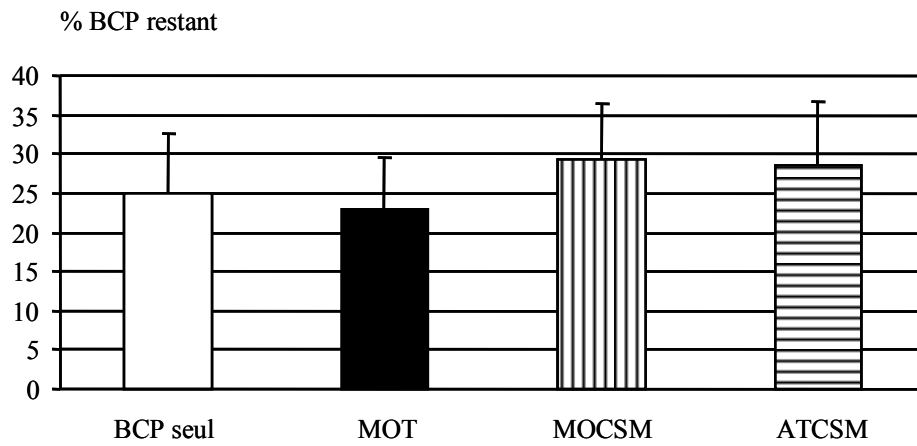
La quantité de granules de BCP restant était de  $29,41\% \pm 6,92$  après implantation de granules de BCP associés aux MO CSMs en terrain irradié.

La quantité de granules de BCP restant était de  $28,50\% \pm 8,17$  après implantation de granules de BCP associés aux AT CSMs en terrain irradié.

Les résultats quantitatifs et statistiques de la dégradation de la céramique sont rapportés dans le Tableau N°XXIV et la Figure N°28.

	<b>Valeur de p</b>	
<b>BCP seul - BCP + MOT</b>	0,643	ns
<b>BCP seul - BCP + MO CSM</b>	0,836	ns
<b>BCP seul - BCP + AT CSM</b>	0,809	ns
<b>BCP + MOT – BCP + MO CSM</b>	0,457	ns
<b>BCP + MOT - BCP + AT CSM</b>	0,810	ns
<b>BCP + MO CSM - BCP + AT CSM</b>	0,622	ns

**Tableau N°XXIV : résultats des tests statistiques de la dégradation de la céramique de BCP en fonction du type de comblement effectué**



**Figure N°28 : dégradation de la céramique de BCP en fonction de l'association d'une greffe de MOT, de MO CSMs ou d'AT CSMs**

## 4. DISCUSSION

---

A notre connaissance, cette étude était la première à évaluer la reconstruction osseuse à l'aide d'un biomatériau phosphocalcique associé soit à une greffe de moelle osseuse totale, soit à des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse ou de tissu adipeux dans un os préalablement irradié.

Le modèle animal utilisé dans cette étude était le même que dans l'étude précédente. Il s'est efforcé de s'approcher au plus près des conditions de traitement oncologique de tumeurs localisées au niveau des VADS et avait pour objectif de reproduire les séquelles d'irradiation de l'os. La race de rats consanguins de souche Lewis A1-haplotype RT1<sup>a</sup> (Centre d'élevage R. Janvier, Le Genest St. Isle, France) a été choisie en raison de sa tolérance à une allogreffe tissulaire [176]. Aucun traitement immunosuppresseur n'a été nécessaire pour cette étude et ce modèle de rat a permis d'éviter le rejet de greffe et la maladie du greffon contre l'hôte. Le choix d'une irradiation en unidose a permis de limiter les fractionnements et donc le nombre d'anesthésies des animaux. L'unidose de 20 grays de rayons X qui a été délivrée correspond à l'équivalent biologique de séquelles d'irradiation à 60 Gy délivrés de façon fractionnée. Le choix du site d'irradiation retenu a été les membres inférieurs des animaux, en raison de la difficulté de concevoir une méthode de radioprotection encéphalique et médullaire suffisamment fiable en cas d'irradiation faciale. L'irradiation des animaux a provoqué pour l'un d'entre eux une entérite radique (syndrome gastro-intestinal) ; ce syndrome est un effet secondaire d'une irradiation de l'abdomen entraînant une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale consécutive à la dénudation de l'épithélium intestinal [184]). Celui-ci a entraîné une fragilité accrue de l'animal, mort en peropératoire. Cet effet secondaire est connu et peut également survenir chez l'homme lors d'une irradiation à forte dose. Il peut se compliquer de pertes hydro-minérales importantes et voire d'une septicémie pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient [184,185]. En dehors de ce cas, il n'y a pas eu de complication majeure liée à l'irradiation. Les incidents survenus (radiodermite et dépilation) étaient ceux habituellement rencontrés avec ce type d'irradiation localisée.

Le choix de l'utilisation de granules de BCP comme biomatériau de substitution osseuse a été effectué en raison de l'effet cumulé sur la néoformation osseuse obtenue après association de ces granules à une greffe de moelle osseuse totale en terrain irradié [19]. La qualité et la

richesse de la moelle osseuse obtenue par vidange du fût médullaire fémoral (« flush-out ») étaient conformes aux données publiées relatives au contenu de la moelle osseuse du rat [177] et aux données de nos précédentes études [19,182]. Le choix de l'utilisation de CSMs issues de moelle osseuse totale a été effectué en raison des capacités de différenciation ostéoblastique de ces cellules [138,139]. De la même façon, le choix de l'utilisation de CSMs issues du tissu adipeux a été effectué en raison de ces mêmes propriétés de différenciation ostéoblastique démontrées plus récemment [140,141]. L'idée d'utiliser des cellules issues du tissu adipeux était très séduisante en raison de la plus grande complexité d'obtention de moelle osseuse chez l'homme. De plus, le volume obtenu est plus faible et la qualité de la moelle osseuse diminue avec l'âge [145,146]. L'obtention de tissu adipeux humain (liposuccion) est effectivement plus aisée que l'obtention de moelle osseuse (crête iliaque [124]) et la quantité disponible plus importante. Par ailleurs, il semblerait que le taux de CSMs issues du tissu adipeux ne diminue pas avec l'âge de l'individu [144]. La mise en culture des cellules issues de la moelle osseuse totale et du tissu adipeux épидидymaire des rats Lewis1A a permis leur prolifération *in vitro* conforme aux données habituellement publiées [124]. Par ailleurs, l'utilisation d'un milieu ostéogénique a permis à ces cellules de produire une matrice extra-cellulaire minéralisée.

L'implantation de granules de BCP seuls après irradiation s'est accompagnée d'une faible repousse osseuse, sous la forme de travées osseuses très peu nombreuses, mais au contact du biomatériau. Cette néoformation osseuse a prédominé dans les espaces profonds, à partir de l'os situé en périphérie de la perte de substance. Un phénomène de fibrose a été dans certains cas observé entre les granules de BCP ou à leur contact au sein des défauts osseux irradiés. Ces observations ont illustré d'une part la biotolérance et biocompatibilité du matériau utilisé et d'autre part, la propriété d'ostéoconduction de ce même biomatériau, bien que faible au sein d'un os irradié. Ces résultats étaient similaires à ceux d'une précédente étude utilisant également des granules de BCP [19] et à ceux utilisant un biomatériau injectable [182]. Certains auteurs ont émis des réserves quant à la qualité de l'ostéointégration de céramiques de phosphates de calcium en territoire irradié [17,113]. En effet, le contact précoce entre le biomatériau implanté et les cellules du remodelage osseux indispensable à une stimulation des processus de croissance est déficient en territoire irradié. Des modifications interviennent à tous les niveaux du processus de formation osseuse et de son remodelage aboutissant à une diminution des capacités de cicatrisation et de réparation osseuse [63,64].

La repousse osseuse était significativement plus dense lors d'une association de moelle osseuse totale aux granules de BCP. L'apposition osseuse était observée sous la forme d'un os jeune, disposé autour des granules de BCP. Cette néoformation osseuse était observée à proximité de l'os résiduel, mais également en profondeur des zones implantées, entre les granules de BCP et au sein de leurs espaces poreux. Ces résultats étaient concordants avec ceux d'une précédente étude utilisant également des granules de BCP [19] et ceux de notre deuxième étude utilisant un biomatériau injectable [182]. Cette néoformation osseuse témoigne d'un processus différent de l'ostéoconduction simple, puisque la formation osseuse n'est pas seulement guidée par la surface des granules de BCP, mais semble débiter également au sein des espaces poreux. La moelle osseuse totale comporte, en plus de toutes les autres cellules, deux types de cellules souches, les CSMs et les CSHs, impliquées dans l'homéostasie osseuse et dans le renouvellement des cellules sanguines périphériques matures [52]. La déplétion médullaire post-radique explique en partie les faibles capacités de cicatrisation d'un os irradié [48-51]. Il est donc possible de supposer que certaines cellules issues de la greffe de moelle osseuse totale mise en place avec les granules de BCP en terrain irradié aient été capables d'adhérer et de se différencier à la surface du matériau implanté pour favoriser une néoformation et un remodelage osseux.

L'association de CSMs issues de la moelle osseuse totale aux granules de BCP n'a pas permis d'augmenter la néoformation osseuse en terrain irradié. Pourtant, certains auteurs ont montré que l'utilisation des CSMs issues de moelle osseuse en comparaison avec de la moelle osseuse totale permettait une meilleure néoformation osseuse, en particulier lors de l'utilisation de CSMs prédifférenciées [159,186]. Néanmoins, ces résultats ont été montrés en site osseux non irradié [187]. L'altération de la cicatrisation osseuse post-radique est en partie liée à une hypovascularisation radio-induite [54,55]. Dans notre étude, l'utilisation de CSMs non différenciées avait également pour objectif de laisser toutes les potentialités de différenciation à ces cellules ; en effet, certains auteurs ont démontré que les CSMs pouvaient s'orienter, dans certaines conditions, vers un phénotype de cellules endothéliales et favoriser ainsi la néovascularisation [147-149]. Néanmoins, la présence d'une cytokine, le VEGF, est également requise pour favoriser cette orientation ; or, Dudziak et Coll. ont montré une diminution post-radique de la production de VEGF [47]. Ainsi, l'utilisation d'une greffe de MOT a pu permettre d'apporter localement les CSMs et les CSHs mais également les nombreux facteurs de croissance indispensables à la cicatrisation osseuse [181]. La sélection



et l'utilisation de CSMs seules n'ont pas apporté ces CSHs et facteurs de croissance, ce qui pourrait expliquer l'absence de néoformation osseuse observée dans cette étude.

L'association de CSMs issues du tissu adipeux aux granules de BCP n'a pas non plus permis d'augmenter la néoformation osseuse en terrain irradié. De plus, des « lacunes » visibles en microscopie photonique ont été fréquemment observées au contact des granules de BCP, laissant supposer la présence de tissu adipeux. Une nécrose médullaire peut parfois être observée sous forme graisseuse après irradiation, néanmoins les « lacunes » n'ont été observées qu'au contact du biomatériau implanté. Ces « lacunes » pourraient être liées à la présence d'adipocytes mis en culture et implantés malgré la procédure d'isolation des CSMs. Enfin, ces « lacunes » pourraient être liées à une orientation des CSMs sélectionnées vers un phénotype d'adipocytes ; en effet, les CSMs issues d'un tissu adipeux s'orientent vers un phénotype ostéoblastique uniquement en présence de conditions de culture adéquates [141], l'os irradié ne constituant sans doute pas un environnement favorable pour cette orientation.

Néanmoins, il serait intéressant d'évaluer ces mêmes associations, MO CSMs et AT CSMs aux granules de BCP, en territoire ectopique, sous-cutané ou intra-musculaire. En effet, Ohgushi et Coll. ont montré qu'une association de CSMs à un biomatériau implanté en site ectopique sous-cutané permettait d'obtenir un effet ostéoinducteur [18].

## 5. CONCLUSION

---

L'étude de la reconstruction osseuse à l'aide d'un biomatériau associé soit à une greffe de MOT, soit à des CSMs issues de moelle osseuse ou de tissu adipeux n'avait jamais été menée jusqu'à présent dans un os préalablement irradié.

Le modèle animal utilisé dans cette étude et les résultats obtenus confortent les études réalisées au préalable [19,182]. Ce modèle animal expérimental a permis en effet d'envisager l'allogreffe de moelle osseuse et l'adjonction de CSMs grâce à l'utilisation d'un modèle animal consanguin sans l'utilisation de traitement immunosuppresseur.

Cette étude confirme par ailleurs que les granules de BCP implantés en territoire irradié sont ostéoconducteurs mais que leur utilisation seule ne permet pas une réparation osseuse significative. La réalisation d'une greffe de moelle osseuse totale procure au biomatériau d'excellentes propriétés ostéoconductrices en territoire irradié.

L'utilisation de CSMs issues de moelle osseuse ou de tissu adipeux dans cette étude n'a pas permis d'obtenir une néoformation osseuse significative. Ces résultats sont sans doute liés à la multiplicité des facteurs intervenant dans la réparation osseuse, néoformation osseuse et néo angiogénèse.



**V. CONCLUSIONS GENERALES DE L'ETUDE -  
PERSPECTIVES**

En pratique clinique quotidienne, les chirurgiens sont confrontés aux difficultés de la reconstruction osseuse après chirurgie d'exérèse d'une nouvelle tumeur, d'une récurrence tumorale en territoire irradié ou après résection d'une ostéoradionécrose. Par ailleurs, ils sont également confrontés aux capacités de cicatrisation réduites après extraction dentaire ou lors de la mise en place d'implants intra- ou extra-oraux susceptibles de déclencher une ostéoradionécrose après une irradiation cervico-faciale.

Dans ce contexte, cette étude a eu pour but d'évaluer la place que pouvaient prendre les substituts osseux phosphocalciques, sous diverses formes galéniques, et l'intérêt de leur associer une greffe de cellules autologues, moelle osseuse totale ou CSMs, en territoire irradié.

Ces études ont été menées chez l'animal, étape préalable indispensable avant d'envisager des essais cliniques humains. Dans un premier temps, ce travail a permis l'évaluation des manifestations radiologiques et anatomopathologiques de très fortes doses d'irradiation sur l'histopathologie et la cicatrisation osseuses et la mise au point d'un nouveau modèle animal de séquelles d'irradiation et d'ostéoradionécrose localisée capable de servir de base à l'étude de thérapies basées sur l'ingénierie tissulaire osseuse.

Dans un second temps, cette étude a eu pour but de définir le comportement de substituts osseux phosphocalciques, sous forme de granules ou sous forme injectable, mis en place au sein de pertes de substances créées après une irradiation à des doses thérapeutiques et d'évaluer leur efficacité dans la reconstruction osseuse. Le modèle utilisé s'est révélé fiable, reproductible et a permis l'obtention de résultats qualitatifs et quantitatifs.

Le phosphate de calcium, utilisé sous forme de granules ou sous forme injectable, était biotoléré en territoire irradié. Il n'y a eu ni rejet, ni infection. Néanmoins, l'ostéoconduction du matériau était très faible lors de son implantation dans un site porteur de séquelles d'irradiation. Les propriétés d'ostéoconduction étaient très limitées et la néoformation osseuse non significativement augmentée par le biomatériau seul, quelle que soit la forme galénique testée.

L'apport de moelle osseuse totale a montré quant à elle améliorer de façon significative la repousse osseuse en territoire irradié. La néoformation osseuse, après implantation dans un site de séquelles d'irradiation d'un biomatériau associé à une greffe de moelle osseuse totale,

a permis d'atteindre la quantité d'os néoformé obtenue dans un défaut osseux non irradié. L'adjonction de moelle osseuse totale a amélioré significativement les propriétés ostéoconductrices du biomatériau implanté. Les probables carences de structures vasculaires dans l'environnement péri-implantaire et les probables diminutions de cellules souches au sein de cet os irradié ne permettraient pas de fournir pas au matériau implanté les populations cellulaires et facteurs de croissance nécessaires à la néoformation osseuse.

L'adjonction de CSMs seules au biomatériau n'a pas apporté d'amélioration significative de la qualité de la repousse osseuse. Ces résultats peuvent s'expliquer notamment par la déplétion médullaire radio-induite et par la déficience des facteurs ostéogéniques et angiogéniques initiant la réparation osseuse.

Les résultats obtenus dans ce travail confortent les travaux préalablement initiés. Ils permettent d'envisager sérieusement l'intérêt de comblements osseux par des substituts osseux phosphocalciques associés à des cellules de moelle osseuse totale en territoire préalablement irradié. Des travaux complémentaires auront pour objectif de préciser les limites des indications de ces thérapeutiques et de préciser le devenir des cellules implantées dans les phénomènes d'ostéogénèse, d'angiogénèse, ... Les techniques d'ingénierie tissulaire osseuse utilisées pourront être testées dans des conditions extrêmes et en particulier dans un site d'ostéoradionécrose. Quoiqu'il en soit, l'efficacité de telles thérapeutiques en territoire irradié semble résider dans l'apport exogène de moelle osseuse totale. La potentialisation de ces techniques d'ingénierie tissulaire pourrait également être envisagée par adjonction de CSMs, prédifférenciées ou non, à un biomatériau implanté avec une greffe de moelle osseuse totale.

**VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Hermanek P, Hutter R, Sobin L, Wagner G, Wittenkind C. TNM classification of malignant tumours. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo. Springer 1987;371.
2. Scully C, Porter S. ABC of oral health. Oral cancer. *Bmj* 2000;321:97-100.
3. Tobias JS. Cancer of the head and neck. *Bmj* 1994;308:961-6.
4. Breton P, Seguin P. Ostéoradionécroses. *Encycl Méd Chir Stomatologie - Odontologie I*, Elsevier Ed. Paris 1996;22-062-D-20.
5. Raoul G, Maes JM, Pasquier D, Nicola J, Ferri J. Ostéoradionécroses des maxillaires (maxillaire et mandibule). *Encycl Méd Chir Stomatologie*, Elsevier Ed. Paris 2005;22-062-D-20.
6. Ang E, Black C, Irish J, Brown DH, Gullane P, O'Sullivan B, Neligan PC. Reconstructive options in the treatment of osteoradionecrosis of the craniomaxillofacial skeleton. *Br J Plast Surg* 2003;56:92-9.
7. Deutsch M, Kroll SS, Ainsle N, Wang B. Influence of radiation on late complications in patients with free fibular flaps for mandibular reconstruction. *Ann Plast Surg* 1999;42:662-4.
8. Sabo D, Brocai DR, Eble M, Wannemacher M, Ewerbeck V. Influence of extracorporeal irradiation on the reintegration of autologous grafts of bone and joint. Study in a canine model. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82:276-82.
9. Schultze-Mosgau S, Erbe M, Keilholz L, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Minge N, Neukam FW. Histomorphometric analysis of irradiated recipient vessels and transplant vessels of free flaps in patients undergoing reconstruction after ablative surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000;29:112-8.
10. Clayman L. Clinical controversies in oral and maxillofacial surgery: Part two. Management of dental extractions in irradiated jaws: a protocol without hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:275-81.
11. Gourmet R, Chaux-Bodard AG. Tooth extraction in irradiated areas. *Bull Cancer* 2002;89:365-8.
12. Maire F, Borowski B, Collangettes D, Farsi F, Guichard M, Gourmet R, Kreher P. Standards, Options and Recommendations (SOR) for good practices in dentistry for head and neck cancer patients. Federation of the French Cancer Centres (FNCLCC). *Bull Cancer* 1999;86:640-65.
13. Sabin P, Labbe D, Ferrand JY, Kaluzinski E, Compere JF. Implant-supported prosthesis. The significance of endosseous and peri-osseous implants. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1997;98:248-52.
14. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 1991;15:1-201.



15. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002;81-98.
16. Breen SL, Battista JJ. Radiation dosimetry in human bone using electron paramagnetic resonance. *Phys Med Biol* 1995;40:2065-77.
17. Kudo M, Matsui Y, Ohno K, Michi K. A histomorphometric study of the tissue reaction around hydroxyapatite implants irradiated after placement. *J Oral Maxillofac Surg* 2001;59:293-300; discussion 301.
18. Ohgushi H, Dohi Y, Tamai S, Tabata S. Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 1993;27:1401-7.
19. Malard O, Bouler J-M, Guicheux J, Gauthier O, Lerouxel E, Daculsi G. Bone marrow autograft associated to macroporous biphasic calcium phosphate for bone substitution in an animal model of sequels of radiotherapy. *Key Engineering Materials* 2005;284-286:285-288.
20. Malard O, Guicheux J, Bouler J-M, Gauthier O, Beauvillain de Montreuil C, Aguado E, Pilet P, LeGeros R, Daculsi G. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005;36:323-330.
21. Barthélémy I, Sannajust JP, Revol P, Mondié JM. Cancers de la cavité buccale. Préambule, épidémiologie, étude clinique. *Encycl Méd Chir Stomatologie*, Elsevier Ed. Paris 2005;22-063-A-10.
22. Lefebvre JL, Chevalier D, Demaille A. Epidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures. *Encycl Méd Chir Oto-rhino-laryngologie*, Elsevier Ed. Paris 1996;20-949-A-10:8.
23. Panosetti E, Luboinski B, Mamelle G, Richard JM. Multiple synchronous and metachronous cancers of the upper aerodigestive tract: a nine-year study. *Laryngoscope* 1989;99:1267-73.
24. Brugere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. *Cancer* 1986;57:391-5.
25. Bignoumba C, Lerouxel E, Renaudin FK, Peuvrel P, Beauvillain de Montreuil C, Malard O. Maxillary sinus cancers: Prognosis and quality of life: a retrospective study of 22 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2006;123:26-33.
26. Barrellier P, Gery B, Granon C. Indications thérapeutiques dans les cancers de la cavité buccale. *Encycl Méd Chir Stomatologie*, Elsevier Ed. Paris 1999;22-065-G-10:6.
27. Dobrowsky W, Dobrowsky E, Strassl H, Braun O, Gritzmann N, Scheiber V. Combined modality treatment of advanced cancers of the oral cavity and oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;20:239-42.
28. Edwards DM, Johnson NW. Treatment of upper aerodigestive tract cancers in England and its effect on survival. *Br J Cancer* 1999;81:323-9.

29. Védrine PO, Meghachi A, Jankowski R, Simon C. Chirurgie des tumeurs sinusiennes. *Encycl Méd Chir Techniques chirurgicales -Tête et cou*, Elsevier Ed. Paris 2005;46-170.
30. Altan D, Hans S, Brasnu D, Housset M. Radiothérapie externe dans les cancers de la tête et du cou. *Encycl Méd Chir Oto-rhino-laryngologie*, Elsevier Ed. Paris 2004;20-902-A-10.
31. Géry B, Brune D, Barrellier P. Radiothérapie des cancers de la cavité buccale. *Encycl Méd Chir Stomatologie*, Elsevier Ed. Paris 1999;22-065-D-10:11.
32. Beauvillain de Montreuil C, Peuvrel P, Rolland F, Vignoud J. Chimiothérapie dans le traitement des cancers des voies aérodigestives supérieures (lymphome malin exclu). *Encycl Méd Chir Oto-rhino-laryngologie*, Elsevier Ed. Paris 1997;20-901-F-10:8.
33. Little JB. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:337-52.
34. Bourhis J, Calais G, Lapeyre M, Tortochaux J, Alfonsi M, Sire C, Bardet E, Rives M, Bergerot P, Rhein B, Desprez B. Concomitant radiochemotherapy or accelerated radiotherapy: analysis of two randomized trials of the French Head and Neck Cancer Group (GORTEC). *Semin Oncol* 2004;31:822-6.
35. Rudat V, Wannemacher M. Role of multimodal treatment in oropharynx, larynx, and hypopharynx cancer. *Semin Surg Oncol* 2001;20:66-74.
36. Tubiana M, Arriagada R, Sarrazin D. Human cancer natural history, radiation induced immunodepression and post-operative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:477-85.
37. Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 2000;153:245-57.
38. Peiffert D, Hoffstetter S, Lapeyre M, Maire F, Guérif S, Aletti P, Dolivet G, Toussaint B. Curiethérapie des cancers oto-rhino-laryngologiques. *Encycl Méd Chir Oto-rhino-laryngologie*, Elsevier Ed. Paris 1999;20-901-C-10:13.
39. Bardet E, Piot B, Gayet M, Savary V. Gross tumor volume and clinical target volume in radiotherapy. *Tumors of the buccal cavity. Cancer Radiother* 2001;5:606-13.
40. Lee N, Puri DR, Blanco AI, Chao KS. Intensity-modulated radiation therapy in head and neck cancers: An update. *Head Neck* 2005
41. Sciubba JJ, Goldenberg D. Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol* 2006;7:175-83.
42. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:199-212.
43. Malard O, Toquet C, Gayet-Delacroix M, Bordure P, Beauvillain de Montreuil C, Bardet E. Radiation-induced cancers of the pharynx and larynx: a study of five clinical cases. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002;27:68-74.

44. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1341-6.
45. Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Journal of Dental Research* 1997;76:658-64.
46. Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, Klotch DW. Radiation effects on osteoblasts in vitro: a potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:1124-8.
47. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, Longaker MT. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2000;106:1049-61.
48. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Experimental Hematology* 1999;27:1460-1466.
49. Mauch P, Constine L, Greenberger J, Knospe W, Sullivan J, Liesveld JL, Deeg HJ. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1319-39.
50. Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res* 2003;63:5414-9.
51. Song CW, Uckun FM, Levitt SH, Kim TH. Comments on "Radiation dose-fractionation and dose-rate relationships for long-term repopulating hemopoietic stem cells in a murine bone marrow transplant model" by R. van Os, H. Thames, A. W. T. Konings and J. D. Down (*Radiat. Res.* 136, 118-125, 1993). *Radiat Res* 1994;137:414-6.
52. Haynesworth SE, Reuben D, Caplan AI. Cell-based tissue engineering therapies: the influence of whole body physiology. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998;33:3-14.
53. Aitasalo K, Aro H. Irradiation-induced hypoxia in bones and soft tissues: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1986;77:256-67.
54. Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:208-11.
55. 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.
56. Arnold M, Kummermehr J, Trott KR. Radiation-induced impairment of osseous healing: quantitative studies using a standard drilling defect in rat femur. *Radiation Research* 1995;143:77-84.

57. Arnold M, Stas P, Kummermehr J, Schultz-Hector S, Trott KR. Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation. *Radiotherapy and Oncology* 1998;48:259-265.
58. Ayers DC, Pellegrini VD, Jr., Evarts CM. Prevention of heterotopic ossification in high-risk patients by radiation therapy. *Clin Orthop Relat Res* 1991:87-93.
59. Pellegrini VD, Jr., Evarts CM. Radiation prophylaxis of heterotopic bone formation following total hip arthroplasty: current status. *Semin Arthroplasty* 1992;3:156-66.
60. Pellegrini VD, Jr., Konski AA, Gastel JA, Rubin P, Evarts CM. Prevention of heterotopic ossification with irradiation after total hip arthroplasty. Radiation therapy with a single dose of eight hundred centigray administered to a limited field. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:186-200.
61. Taussky D, Cserhati M, Pescia R. Preoperative radiotherapy without femoral shielding for prevention of heterotopic ossification in hydroxyapatite-coated hip prostheses. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121:271-3.
62. Savostin-Asling I, Silverman SJ. Effects of therapeutic radiation on microstructure of the human mandible. *Am J Anat* 1978;151:295-305.
63. Widmann RF, Pelker RR, Friedlaender GE, Panjabi MM, Peschel RE. Effects of prefracture irradiation on the biomechanical parameters of fracture healing. *J Orthop Res* 1993;11:422-8.
64. Pelker RR, Friedlaender GE. The Nicolas Andry Award-1995. Fracture healing. Radiation induced alterations. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1997;341:267-82.
65. Probert JC, Parker BR. The effects of radiation therapy on bone growth. *Radiology* 1975;114:155-62.
66. Morrish RB, Jr., Chan E, Silverman S, Jr., Meyer J, Fu KK, Greenspan D. Osteonecrosis in patients irradiated for head and neck carcinoma. *Cancer* 1981;47:1980-3.
67. Cruess RL. Osteonecrosis of bone. Current concepts as to etiology and pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1986:30-9.
68. Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* 1983;41:283-8.
69. Dambraun R. The pathogenesis of osteoradionecrosis. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1993;94:140-7.
70. Annane D, Depondt J, Aubert P, Villart M, Gehanno P, Gajdos P, Chevret S. Hyperbaric oxygen therapy for radionecrosis of the jaw: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial from the ORN96 study group. *J Clin Oncol* 2004;22:4893-900.

71. Maier A, Gaggl A, Klemen H, Santler G, Anegg U, Fell B, Karcher H, Smolle-Juttner FM, Friehs GB. Review of severe osteoradionecrosis treated by surgery alone or surgery with postoperative hyperbaric oxygenation. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38:173-6.
72. Reuther T, Schuster T, Mende U, Kubler A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients--a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:289-95.
73. Verain A. Post-radiation fluorotherapy. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2004;105:289-90.
74. Maxymiw WG, Wood RE, Liu FF. Postradiation dental extractions without hyperbaric oxygen. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72:270-4.
75. Carl W, Ikner C. Dental extractions after radiation therapy in the head and neck area and hard tissue replacement (HTR) therapy: a preliminary study. *J Prosthet Dent* 1998;79:317-22.
76. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977;16:1-132.
77. Brogniez V, Nyssen-Behets C, Gregoire V, Reychler H, Lengele B. Implant osseointegration in the irradiated mandible. A comparative study in dogs with a microradiographic and histologic assessment. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:234-42.
78. Larsen PE, Stronczek MJ, Beck FM, Rohrer M. Osteointegration of implants in radiated bone with and without adjunctive hyperbaric oxygen. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51:280-7.
79. Schoen PJ, Reintsema H, Raghoobar GM, Vissink A, Roodenburg JL. The use of implant retained mandibular prostheses in the oral rehabilitation of head and neck cancer patients. A review and rationale for treatment planning. *Oral Oncol* 2004;40:862-71.
80. Klotch DW, Prein J. Mandibular reconstruction using AO plates. *Am J Surg* 1987;154:384-8.
81. Militakh ON, Wallace DI, Kriet JD, Tsue TT, Girod DA. The role of the osteocutaneous radial forearm free flap in the treatment of mandibular osteoradionecrosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;133:80-3.
82. Nathanson A, Wersall J. Effects of <sup>60</sup>CO-gamma-irradiation on the early ingrowth of an autogenous bone inlay into an artificial defect in the rabbit mandibula. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1978;12:139-49.
83. Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rodel F, Wehrhan F, Amann K, Kopp J, Thorwarth M, Nkenke E, Grabenbauer G. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor-beta1, and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:1189-96.

84. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000;10-27.
85. Seiler JG, 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc* 2000;9:91-7.
86. Tomford WW, Mankin HJ. Bone banking. Update on methods and materials. *Orthop Clin North Am* 1999;30:565-70.
87. Meylan PR, Duscher A, Mudry A, Monnier P. Risk of transmission of human immunodeficiency virus infection during tympano-ossicular homograft: an experimental study. *Laryngoscope* 1996;106:334-7.
88. Osborn JF, Newesley H. Dynamic aspects of the implant/bone interface. *Dental Implants*, Heimke Ed. Carl Hansen Verlag Munich 1980;111-23.
89. Bouler JM, Trecant M, Delecrin J, Royer J, Passuti N, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J Biomed Mater Res* 1996;32:603-9.
90. Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Aguado E, Daculsi G. Short-term effects of mineral particle sizes on cellular degradation activity after implantation of injectable calcium phosphate biomaterials and the consequences for bone substitution. *Bone* 1999;25:71S-74S.
91. Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 1999;47:28-35.
92. Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P, Boivin G, Melin M, Hartmann D. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:1089-97.
93. Gallur A, Richart O, Descamps M, Thierry B, Anselme K, Flautre B, Hardouin P. Le naphtalène : agent porogène pour l'élaboration de substituts osseux en hydroxyapatite et en phosphate tricalcique. *Actualités en biomatériaux* 1998:127-35.
94. Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:369-72.
95. Guigui P, Plais PY, Flautre B, Viguier E, Blary MC, Chopin D, Lavaste F, Hardouin P. Experimental model of posterolateral spinal arthrodesis in sheep. Part 2. Application of the model: evaluation of vertebral fusion obtained with coral (Porites) or with a biphasic ceramic (Triosite). *Spine* 1994;19:2798-803.
96. Ripamonti U. The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:692-703.

97. Kurioka K, Umeda M, Teranobu O, Komori T. Effect of various properties of hydroxyapatite ceramics on osteoconduction and stability. *Kobe J Med Sci* 1999;45:149-63.
98. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998;19:1473-8.
99. Vuola J, Goransson H, Bohling T, Asko-Seljavaara S. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials* 1996;17:1761-6.
100. Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, Layrolle P. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 2005;36:1086-93.
101. Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1999;20:1799-806.
102. Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, Ross J, Goldstein SA, Jupiter JB, Rosenthal DI. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995;267:1796-9.
103. Daculsi G, Weiss P, Delecrin J, Grimandi G, Passuti N. Brevet n°94-01-414. Composition pour biomatériau : procédé de préparation. (08-02-94)
104. Daculsi G, Weiss P, Bouler J-M, Gauthier O, Millot F, Aguado E. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials. *Bone* 1999;25:59S-61S.
105. Weiss P, Gauthier O, Bouler JM, Grimandi G, Daculsi G. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. *Bone* 1999;25:67S-70S.
106. Gauthier O, Khairoun I, Bosco J, Obadia L, Bourges X, Rau C, Magne D, Bouler J-M, Aguado E, Daculsi G, Weiss P. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J Biomed Mater Res* 2003;66 A:47-54.
107. Gauthier O, Goyenvallé E, Bouler J-M, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2001;12:385-90.
108. Saffarzadeh A, Gauthier O, Humbert T, Weiss P, Bouler J-M, Daculsi G. Maxillary sinus bone grafting with an injectable bone substitute: a sheep study. *Key Engineering Materials* 2004;254-256:193-196.
109. Daculsi G, Rohanizadeh R, Weiss P, Bouler JM. Crystal polymer interaction with new injectable bone substitute; SEM and Hr TEM study. *J Biomed Mater Res* 2000;50:1-7.
110. Weiss P, Obadia L, Magne D, Bourges X, Rau C, Weitkamp T, Khairoun I, Bouler JM, Chappard D, Gauthier O, Daculsi G. Synchrotron X-ray microtomography (on a

- micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials* 2003;24:4591-601.
111. Wang R, Pillai K, Jones PK. Dosimetric measurement of scattered radiation from dental implants in simulated head and neck radiotherapy. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:197-203.
  112. Stenson KM, Balter JM, Campbell JH, Carroll WR. Effects of implantable biomaterials on radiation dosimetry. *Head Neck* 1997;19:384-90.
  113. Pinholt EM, Kwon PH. The effect of therapeutic radiation on canine alveolar ridges augmented with hydroxylapatite. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:250-4.
  114. Brogniez V, D'Hoore W, Gregoire V, Munting E, Reychler H. Implants placed in an irradiated dog mandible: a morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:511-8.
  115. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:1032-44.
  116. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143-55.
  117. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-84.
  118. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells* 2003;21:610-9.
  119. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-90.
  120. Coulombel L. Adult stem cells: being is not being. *Med Sci (Paris)* 2003;19:683-94.
  121. Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 2005;265:55-61; discussion 61-5, 92-7.
  122. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999;48:913-27.
  123. Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T. Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp* 2003;249:118-27; discussion 127-32, 170-4, 239-41.
  124. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
  125. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 2001;44:85-95.



126. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:817-27.
127. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC, Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001;264:51-62.
128. Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 2003;287:289-300.
129. Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gomez I, Yan M, Dujovny M. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res* 2004;26:230-2.
130. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K, Shimizu M, Bhawal UK, Tsuji K, Nakamura K, Kato Y. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2005;20:399-409.
131. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004;50:1522-32.
132. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807-12.
133. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005;308:283-90.
134. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72:570-85.
135. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9-20.
136. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-92.
137. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995;85:929-40.
138. Kasugai S, Todescan R, Jr., Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone

- marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol* 1991;147:111-20.
139. Uchimura E, Machida H, Kotobuki N, Kihara T, Kitamura S, Ikeuchi M, Hirose M, Miyake J, Ohgushi H. In-situ visualization and quantification of mineralization of cultured osteogenic cells. *Calcif Tissue Int* 2003;73:575-83.
  140. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004;178:2-12.
  141. Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2006;34:466-71.
  142. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:845-53.
  143. Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K, Ishihara M. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;76:230-9.
  144. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 2005;116:1686-96.
  145. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999;14:1115-22.
  146. Huibregtse BA, Johnstone B, Goldberg VM, Caplan AI. Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Orthop Res* 2000;18:18-24.
  147. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res* 2004;94:573-4.
  148. Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, Kalka C. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:967-72.
  149. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004;104:2084-6.
  150. Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:353-61.

151. Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 2005;68:1940-3.
152. Kotobuki N, Ioku K, Kawagoe D, Fujimori H, Goto S, Ohgushi H. Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials* 2005;26:779-785.
153. Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, Couillaud S, Passuti N, Daculsi G, Heymann D. Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J Biomed Mater Res* 1999;44:98-108.
154. Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1927-35.
155. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:985-96.
156. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998;16:155-62.
157. Le Nihouannen D, Goyenvalle E, Aguado E, Pilet P, Bilban M, Daculsi G, Layrolle P. Hybrid composites of calcium phosphate granules, fibrin glue, and bone marrow for skeletal repair. *J Biomed Mater Res A* 2006;81A:399-408.
158. Mankani MH, Kuznetsov SA, Shannon B, Nalla RK, Ritchie RO, Qin Y, Robey PG. Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells. *Am J Pathol* 2006;168:542-50.
159. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, Hilbe M, McCool J, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Merkle HP, Rechenberg B, Kaplan DL, Kirker-Head C. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone* 2006;39:922-31.
160. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13.
161. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-6.
162. Schiodt M, Hermund NU. Management of oral disease prior to radiation therapy. *Support Care Cancer* 2002;10:40-3.
163. de Arruda FF, Puri DR, Zhung J, Narayana A, Wolden S, Hunt M, Stambuk H, Pfister D, Kraus D, Shaha A, Shah J, Lee NY. Intensity-modulated radiation therapy for the treatment of oropharyngeal carcinoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:363-73.

164. Jerezek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev* 2002;28:65-74.
165. Curi MM, Dib LL. Osteoradionecrosis of the jaws: a retrospective study of the background factors and treatment in 104 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:540-4; discussion 545-6.
166. Glanzmann C, Gratz KW. Radionecrosis of the mandibula: a retrospective analysis of the incidence and risk factors. *Radiother Oncol* 1995;36:94-100.
167. Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:1088-93; discussion 1093-5.
168. Mitchell MJ, Logan PM. Radiation-induced changes in bone. *Radiographics* 1998;18:1125-36; quiz 1242-3.
169. Malard O. Etude des céramiques phosphocalciques de substitution osseuse en territoire irradié : intérêt d'une autogreffe de moelle osseuse. Thèse de doctorat: Science et vie de la santé, Nantes: Faculté de Chirurgie Dentaire 2004;182.
170. Cuturi M-C, Brouard S. Communication personnelle : fragilité des rats Lewis 1A RT1<sup>a</sup> : adaptations anesthésiques et précautions d'utilisation. [Courrier électronique] Inserm U437-Nantes 2003.
171. Matsumura S, Jikko A, Hiranuma H, Deguchi A, Fuchihata H. Effect of X-ray irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast. *Calcified Tissue International* 1996;59:307-8.
172. Vanderpuye V, Goldson A. Osteoradionecrosis of the mandible. *J Natl Med Assoc* 2000;92:579-84.
173. Peled M, El-Naaj IA, Lipin Y, Ardekian L. The use of free fibular flap for functional mandibular reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:220-4.
174. Supiot S. Communication personnelle : irradiation encéphale de rats. [Courrier électronique] CRLCC-Saint Herblain 2003.
175. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1999;46:103-11.
176. Cuturi M-C, Josien R, Cantarovich D, Bugeon L, Anegon I, Menoret S, Smit H, Douillard P, Soulillou JP. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol* 1994;24:1627-31.
177. Dumas J. Rats d'élevage. Les animaux de laboratoire, collections de l'institut Pasteur, Flammarion Ed. Paris 1953;63-74.

178. Olmsted-Davis EA, Gugala Z, Camargo F, Gannon FH, Jackson K, Kienstra KA, Shine HD, Lindsey RW, Hirschi KK, Goodell MA, Brenner MK, Davis AR. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15877-82.
179. Blouin S, Moreau MF, Weiss P, Daculsi G, Basle MF, Chappard D. Evaluation of an injectable bone substitute (betaTCP/hydroxyapatite/hydroxy-propyl-methyl-cellulose) in severely osteopenic and aged rats. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:570-80.
180. Souedan A, Gan O, Bouler JM, Gouin F, Daculsi G. Biodegradation of synthetic biphasic calcium phosphate and biological calcified substratum by cells of hematopoietic origin. *Cells and Materials* 1995;5:31-44.
181. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-15.
182. Lerouxel E, Weiss P, Giumelli B, Moreau A, Pilet P, Guicheux J, Corre P, Bouler JM, Daculsi G, Malard O. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats. *Biomaterials* 2006;27:4566-72.
183. Corre P. Intérêt du phosphate de calcium biphasé macroporeux dans la reconstruction osseuse en terrain irradié : rôle d'une greffe de moelle osseuse dans la néovascularisation et la repousse osseuse. Master: Sciences chirurgicales - Parcours cancérologie, Paris: Université Paris XI - Paris XII 2005;68.
184. Griffiths NM. The example of gastrointestinal damage induced by ionising radiation: are there accessible markers? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001;47:427-35.
185. Monti P, Wysocki J, van der Meeren A, Griffiths NM. The contribution of radiation-induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multi-organ dysfunction syndrome or failure. *BJR Suppl* 2005;27:89-94.
186. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18:959-63.
187. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997;6:125-34.

## **VII. ANNEXES**

## ANNEXE 1 :

### PROCEDURE DE COLORATION A L' HEMATOXYLINE PHLOXINE SAFRAN (HPS)

- Etapes de la coloration à l' Hématoxyline Phloxine Safran

Etapes	Durée
Toluène	5 minutes
Toluène	5 minutes
Alcool 100%	2 minutes
Alcool 100%	1 minutes
Eau	3 minutes
Hémalun	8 minutes
Eau	3 minutes
Acide trichloracétique	10 secondes
Eau	1 minute
Lithium	30 secondes
Eau	1 minute
Phloxine	3 minutes
Eau	1 minute
Alcool 100%	30 secondes
Alcool 100%	30 secondes
Safran	30 secondes
Alcool absolu	30 secondes
Alcool absolu	30 secondes
Toluène	1 minute
Toluène	1 minute

- **Résultats de la coloration à l' Hématoxyline Phloxine Safran**

Noyau	Bleu foncé
Cytoplasme	Rose
Fibres de collagène	Jaune-Orangé
Erythrocyte	Rouge

- **Préparation des produits pour la coloration à l' Hématoxyline Phloxine Safran**

- Hémalun

Solution prête à l'emploi

- Acide trichloracétique à 3%

Mélanger 30g d'acide trichloracétique en poudre à 1 l d'eau du robinet

- Lithium

Carbonate de lithium à saturation dans l'eau du robinet

- Phloxine

Mélanger 12,5 g de phloxine en poudre à 2,5 l d'eau du robinet

- Safran

Mélanger 20 g de safran en poudre à 1 l d'alcool absolu (laisser reposer 48 h à l'étuve à 56°C)



## ANNEXE 2 :

### PROCEDURE D'INCLUSION DANS LE METHYL-METHACRYLATE (MMA) A – 20°C

- **Fixation** de l'échantillon dans une solution de fixation (ex : formol neutre).
  
- **Déshydratation** de l'échantillon :
  - Alcool à 70° pendant ¼ d'heure,
  - Alcool à 80° pendant ¼ d'heure,
  - Alcool à 90° pendant ¼ d'heure,
  - Alcool à 95° pendant ¼ d'heure,
  - Alcool à 100° pendant ¼ d'heure,
  - Alcool à 100° pendant ¼ d'heure.
  
- **Imprégnation** de l'échantillon :
  - 50% alcool à 100° et 50% Méthyl-Méthacrylate purifié (PMMA) pendant 24h,
  - Méthyl-Méthacrylate purifié pur pendant 24h.
  
- **Inclusion** de l'échantillon :
  - Première étape :
    - Placement de l'échantillon à inclure au centre du flacon en verre,
    - Remplissage d'une solution de 90% de PMMA + 10% de dibutylphtalate + 1% de peroxyde de benzoyle,
    - Remplissage du flacon jusqu'au bord (flacon non fermé),
    - Placement du flacon dans une cloche à vide, pendant 2 heures, à 4°C.
  
  - Deuxième étape :
    - Remplacement de cette solution par 10µl de N,N diméthyl-p-toluidine / ml de solution de PMMA,
    - Fermeture hermétique du flacon,
    - Immersion dans un cristalliseur rempli d'alcool à 70°,
    - Placement de l'ensemble au congélateur à –20°C pendant 24h,
    - La polymérisation se poursuit à température ambiante pendant 48h avant l'exploitation de l'échantillon.

### ANNEXE 3 :

#### PROCEDURE DE COLORATION PAR LE SOLOCHROME-CYANINE R SUR RESINE MMA

- **Etapas de la coloration au Solochrome-Cyanine R**

<b>Etapas</b>	<b>Durée</b>
Immersion dans l'eau distillée	Quelques minutes
Coloration Solochrome-Cyanine R : Solochrome-Cyanine R (1g) + acide acétique glacial (2ml) + eau distillée 98ml	1 heure
Différenciation à l'eau chaude (35°C) jusqu'à épuisement du colorant	Quelques minutes
Déshydratation à l'alcool à 100%	2 x 10 minutes
Remplacement de l'alcool par le toluène	

- **Résultats de la coloration au Solochrome-Cyanine R**

Tissu ostéoïde	Rouge
Tissu calcifié	Gris-Bleu
Front de calcification	Bleu foncé

## ANNEXE 4 :

### PROCEDURE DE PREPARATION DU MILIEU DE TRANSPORT ET DU MILIEU DE CULTURE COMPLET

Le milieu de culture et le milieu de transport ont été préparés de façon stérile sous hôte dans une Flasque F75.

- **Milieu de transport**

- 220 ml (88%) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Eragny, France)
- 25 ml (10%) Sérum de Veau Fœtal (SVF, PAN biotech)
- 2,5 ml (1%) Pénicilline/Streptomycine (pénicilline G à  $10^4$  UI/ml et streptomycine à  $10^4$  µg/ml, Gibco, Eragny, France)

- **Milieu de culture complet N°1**

- 220 ml (88%) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Eragny, France)
- 25 ml (10%) Sérum de Veau Fœtal (SVF, PAN biotech)
- 2,5 ml (1%) L-glutamine (L-glut Gibco, Eragny, France)
- 2,5 ml (1%) Pénicilline/Streptomycine (pénicilline G à  $10^4$  UI/ml et streptomycine à  $10^4$  µg/ml, Gibco, Eragny, France)

- **Milieu de culture complet N°2**

- 220 ml (88%) Alpha Modified Eagle's Medium ( $\alpha$ MEM, Gibco, Eragny, France)
- 25 ml (10%) Sérum de Veau Fœtal (SVF, PAN biotech)
- 2,5 ml (1%) L-glutamine (L-glut Gibco, Eragny, France)
- 2,5 ml (1%) Pénicilline/Streptomycine (pénicilline G à  $10^4$  UI/ml et streptomycine à  $10^4$  µg/ml, Gibco, Eragny, France)

## ANNEXE 5 :

### PROCEDURE DE PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE OSTEOGENIQUE

- **Composition du milieu ostéogénique**

- DMEM, 10% SVF, 1% P/S, 1% L-Glut
- $\beta$ -glycérophosphate 10mM
- Acide ascorbique 50 $\mu$ M
- Vitamine D 0.01 $\mu$ M

- **Préparation du milieu ostéogénique (55 ml)**

- $\beta$ -glycérophosphate : Mw = 216g/mol
  - préparer une solution concentrée de 10 ml à 500 mM
    - peser 1,085g de  $\beta$ -glycérophosphate
    - diluer dans 10 ml de DMEM
    - filtrer sur 0,22  $\mu$ m
    - ensuite prélever 1,1 ml et mettre dans 53,9 ml de milieu complet (DMEM, 10% SVF, 1% P/S, 1% L-Glut)
- Acide ascorbique : Mw = 198.11g/mol
  - préparer une solution concentrée de 10 ml à 1 M
    - peser 1,98g d'acide ascorbique
    - diluer dans 10 ml de DMEM
    - filtrer sur 0,22  $\mu$ m
    - prélever 2,75  $\mu$ l et mettre dans 55 ml de milieu complet contenant le  $\beta$ -glycérophosphate
- Vitamine D : solution en stock de 50  $\mu$ l à  $10^{-5}$  M
  - prendre une aliquote de 50  $\mu$ l de vit D  $10^{-5}$  M
  - mettre 55  $\mu$ l dans 55 ml de milieu complet contenant le  $\beta$ -glycérophosphate et l'acide ascorbique

## ANNEXE 6 :

### PROCEDURE DE COLORATION AU ROUGE ALIZARINE

Afin de déterminer la minéralisation de la matrice extra-cellulaire, une coloration rouge alizarine est réalisée sur les cellules cultivées en plaque de 6 puits en présence d'un milieu ostéogénique et d'un milieu contrôle.

- **Étapes de la coloration au Red alizarine**

- *Semer les cellules*

- Prendre 1 Flasque F75 de cellules (MO CSMs ou AT CSMs)
- Enlever le milieu de culture
- Mettre 5 ml de trypsine/EDTA
- Incuber 2 min à 37°C
- Récupérer les 5 ml et les mettre dans 10 ml de DMEM + 10% SVF
- Centrifuger 8 min à 1200 rpm
- Reprendre le culot dans 10 ml de milieu de culture complet N°1 (DMEM, 10% SVF, 1% P/S et 1% L-glut)
- Compter les cellules au bleu trypan
- Répartir 50 000 à 100 000 cellules par puits (fonction nombre de cellules obtenues) dans des plaques de 6 puits.

Semer les cellules selon schéma suivant :

J15

CSMs Milieu contrôle	→	→
CSMs Milieu contrôle	→	→

J30

CSMs Milieu contrôle	→	→
CSMs Milieu contrôle	→	→

- ***Multiplication et différenciation des cellules***

- Changer le milieu de culture des puits supérieurs avec du milieu ostéogénique frais, tous les deux à trois jours
- Changer le milieu de culture des puits inférieurs avec du milieu contrôle N°1, tous les deux à trois jours

CSMs Milieu ostéogénique		→
CSMs Milieu contrôle		→

CSMs Milieu ostéogénique		→
CSMs Milieu contrôle		→

• **Rouge alizarine**

Rouge alizarine de Sigma-Aldrich. Utilisation d'une solution de rouge alizarine 2% à pH 4,2.

- ***Coloration rouge alizarine***

- Enlever le milieu de culture (contrôle et ostéogénique)
- Incuber avec le rouge alizarine filtré pendant 2 min (1 ml pour une plaque de 6 puits)
- Rincer 3 fois à l'eau distillée (pour éliminer les excès de colorant)
- Les cellules sont observées en microscopie photonique à contraste de phase.

## ANNEXE 7 :

### PROCEDURE D'ISOLATION DE CELLULES STROMALES A PARTIR DE TISSU ADIPEUX DE RAT

- Les prélèvements de tissu adipeux sont transportés de l'UTE au laboratoire dans 20 ml de milieu de transport.
- Les prélèvements sont ensuite transférés dans une solution de collagénase (sigma collagénase crude type I A C-2674) dans HBSS (5 l de collagénase dans HBSS à 1mg/ml + 20 ml d'HBSS) : 1 g de tissu adipeux dans 25 ml de suspension de collagénase. Le tissu adipeux est coupé dans la solution de collagénase avec des ciseaux à bout rond.
- Incubation à 37°C sous agitation (150 strokes/min) pendant 1 heure (la suspension devient crémeuse)
- Récupérer les tubes et ajouter 1 volume de DMEM + 10% SVF pour stopper la réaction.
- Laisser décanter quelques minutes sous hotte jusqu'à l'obtention de 2 phases :
  - Une phase supérieure contenant la graisse et les adipocytes,
  - Une phase inférieure contenant la fraction stromale.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 1200 tours/min.
- Jeter la phase adipocytaire supérieure par aspiration à la pipette.
- Resuspendre la phase inférieure et filtrer la phase inférieure sur tamis cellulaire de 70 µm.
- Centrifuger 8 min à 1200 tours/min.
- Rincer les cellules avec le milieu de culture complet et on peut répéter la centrifugation pour bien rincer les cellules.
- Compter les cellules au bleu trypan.
- Semer les cellules.
- Changer le milieu de culture tous les deux jours, conserver ces cellules sub-confluentes pour éviter une différenciation spontanée.

## ANNEXE 8 :

### PROCEDURE D'INCLUSION DANS LE GLYCOL-METHACRYLATE (GMA)

- **La fixation** a été réalisée en extemporané dans un milieu composé de paraformaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate (PBS, Seroderm, Berlin, Allemagne) pendant 72 heures à 4°C.
- **La déshydratation** a été réalisée dans des bains successifs d'éthanol de degré croissant (70, 80, 95, puis 100°) durant 36 heures chacun à 4°C. Puis les échantillons ont été placés dans l'acétone pure pendant 36 heures à 4°C.
- **L'imprégnation** a été réalisée en résine Glycol-Méthacrylate (GMA) dans deux bains successifs pendant un total de 7 jours à -20°C.

Le Glycol-Méthacrylate (GMA) a été fabriqué par un mélange de :

- Méthyl-Méthacrylate (Osi Produits Chimiques, Saint-Quentin Fallavier, France)
- Polyéthylène-Glycol 400 (Prolabo, Paris, France)
- Peroxyde de Benzoyle (Merck Produits Chimiques, Darmstadt, Allemagne).

- **L'inclusion** en résine GMA a été réalisée avec milieu initiateur pendant 72 heures à 4°C. La polymérisation de la résine a été initialisée à l'aide du milieu initiateur, composé de N-N-Diméthyl-Alanine (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et de Propanol-2 (Prolabo Recaptur, Paris, France).



## ANNEXE 9 :

### PROCEDURE DE COLORATION PAR LE TRICHROME DE GOLDNER SUR RESINE GMA

- **Étapes de la coloration au Trichrome de Goldner**

<b>Étapes</b>	<b>Durée</b>
Eau distillée	15 minutes
Eau distillée	15 minutes
Hématoxyline ferrique de Weigert	20 minutes
Eau du robinet	Lavage
Alcool acide 0,5%	
Eau du robinet	20 minutes
Ponceau / acide fuschine / azophloxine	5 minutes
Acide acétique 1%	10 secondes
Acide phosphomolybdique / orange G	20 minutes
Acide acétique 1%	10 secondes
Vert lumière	5 minutes
Eau du robinet	Rinçage
Blot dry	
Ethanol 100°	Rinçage
Ethanol 100°	Rinçage

- **Résultats de la coloration au Trichrome de Goldner**

<b>Noyaux</b>	<b>Bleu/Noir</b>
Os minéralisé et collagène	Vert
Cytoplasme	Rouge
Les ostéoïdes	Rouge
Erythrocytes	Orange

- **Préparation des produits pour la coloration au Trichrome de Goldner**

- ***Hématoxyline ferrique de Weigert***

Pour préparer ce colorant, on prépare deux solutions A et B que l'on mélange à volume égal de manière extemporanée.

- HCl 25%

On ajoute 100 ml d'HCl concentré (37%) à 50 ml d'eau distillée.

- Solution A :

On ajoute 100 ml d'éthanol 95% à 1 g d'hématoxyline cristallisée. On mélange à l'aide d'un agitateur magnétique. Cette solution doit vieillir un mois à la lumière du jour avant utilisation.

- Solution B :

On mélange 1,16 g de ferric chloride à 97 ml d'eau distillée, puis on ajoute 3 ml d'HCl 25%.

On mélange à l'aide d'un agitateur magnétique.

- ***Ponceau de xylidine / fuschine acide***

On mélange 1,5 g de Ponceau de xylidine et 0,5 g d'acide fuschine à 98 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite 2 ml d'acide acétique glacial.

- ***Azophloxine***

On mélange 0,5 g d'azophloxine à 99,4 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite 0,6 ml d'acide acétique glacial.

- ***Ponceau / acide fuschine / azophloxine***

On ajoute 12 ml de la solution de Ponceau de xylidine / fuschine acide à 8 ml d'azophloxine, puis 16 ml d'acide acétique à 1% et 64 ml d'eau distillée.

- ***Acide phosphomolybdique / orange G***

On ajoute 0,6 g d'acide phosphomolybdique à 0,4 g d'orange G et on ajoute 100ml d'eau distillée.

- ***Vert lumière***

On ajoute 0,2g de vert lumière à 99,8ml d'eau distillée et on ajoute 0,2 ml d'acide acétique glacial.

- ***Alcool acide***

On ajoute 0,5 ml d'acide chlorhydrique à 99,5 ml d'éthanol 70%.

- ***Acide acétique 1%***

On ajoute 1 ml d'acide acétique glacial à 99 ml d'eau distillée.

## ANNEXE 10 :

### PROCEDURE DE COLORATION PAR LE PENTACHROME DE MOVAT SUR RESINE GMA

- **Etapes de la coloration au Pentachrome de Movat**

Etapes	Durée
Bleu alcian	10 minutes
Rinçage à l'eau du robinet	5 minutes
Ethanol alcalin	60 minutes
Eau du robinet	10 minutes
Eau distillée	Rincer
Hématoxyline ferrique de Weigert	10 minutes
Eau distillée	Rincer
Eau du robinet	15 minutes
Eau distillée	Rincer
Brillant Crocein/Fushine acide	15 minutes
Acide acétique 0,5%	Rincer
Acide phosphotungstique 5%	20 minutes
Acide acétique 0,5%	2 minutes
Alcool 100°	3 x 5 minutes
Safran du Gatinais	60 minutes
Alcool 100°	Quelques secondes
Méthylcyclohexane	Quelques secondes

- **Résultats de la coloration au Pentachrome de Movat**

Noyaux	Noir/Gris
Cytoplasme	Rouge
Fibres de collagène	Jaune
Fibres élastiques	Rouge
Cartilage calcifié	Bleu-Vert
Tissu ostéoïde	1.1.1.1. <b>Rouge</b>
Os minéralisé Cartilage	Vert-Jaune brillant

- **Préparation des produits pour la coloration au Pentachrome de Movat**

***Bleu alcian***

- Bleu alcian 1 g
- Eau distillée 100 ml

***Ethanol alcalin***

- Ammonium hydroxyde 25% 1 ml
- Alcool 95% 300 ml

***Hématoxyline ferrique de Weigert***

- *Solution A* :
  - o Hématoxyline crist 10 g
  - o Alcool 95% QSP 100 ml
- *Solution B* :
  - o Ferric chloride 1,16 g
  - o HCl 35% 3 ml
  - o Eau distillée QSP 100 ml
- Mélanger A et B en parties égales
- L'HCl nécessaire à la préparation de cette solution est obtenu en ajoutant à 100 ml d'HCl concentré (27%), 50 ml d'eau distillée

***Brillant Crocein/Fushine acide***

- *Solution A* :
  - o Brillant Cocein 0,1 g
  - o Eau distillée 99,5 ml
  - o Acide acétique glacial 0,5 ml
- *Solution B* :
  - o Fushine acide 0,1 g
  - o Eau distillée 99,5 ml
  - o Acide acétique glacial 0,5 ml
- Mélanger 4 volumes de A pour 1 volume de B

***Safran du Gatinais***

- Safran Gatinais 6 g
- Alcool 100% 100 ml
- Mettre la solution à l'étuve 58°C pendant 48 heures avant de l'utiliser.
- Conserver cette solution dans un flacon sombre.

## **VIII. COMMUNICATIONS ISSUES DE CES TRAVAUX**

## Communications écrites

### **Effects of high-doses of ionizing radiations on bone: a histological study in rats.**

**E. Lerouxel**, A. Moreau, J.M. Bouler, B. Giumelli, G. Daculsi, P. Weiss, O. Malard  
Archives of orthopaedic and trauma surgery (soumis en janvier 2007)

### **Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats.**

**E. Lerouxel**, P. Weiss, B. Giumelli, A. Moreau, P. Pilet, J. Guicheux, P. Corre, J.M. Bouler, G. Daculsi, O. Malard.  
Biomaterials, 2006, sept 27 (26), 4566-4572.

### **Bone loss and teeth. Perte osseuse et dents.**

F. Bodic, L. Hamel, **E. Lerouxel**, M.F. Baslé, D. Chappard.  
Joint Bone Spine. (Vol. 72) 2005: 215-221.  
Revue du Rhumatisme (Vol. 72) 2005 : 397-403.

### **Bone marrow autograft associated to macroporous biphasic calcium phosphate for bone substitution in an animal model of sequels of radiotherapy.**

O. Malard, J.M. Bouler, J. Guicheux, O. Gauthier, **E. Lerouxel**, G. Daculsi.  
Key Engineering Materials Vols. 284-286 (2005) pp. 285-288.

### **Maxillary sinus cancers: prognosis and quality of life: A 22 cases retrospective study.**

#### **Cancers du sinus maxillaire : pronostic et qualité de vie : à propos d'une étude rétrospective de 22 cas.**

C. Bignoumba, **E. Lerouxel**, K. Renaudin, P. Peuvrel, C. Beauvillain de Montreuil, O. Malard.  
Annales d'Oto-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale, 2006 ; 123, 1, 26-33.

### **Mandibular bone loss in an animal model of male osteoporosis (the orchidectomized rat): a radiographic and densitometric study.**

**E. Lerouxel**, H. Libouban, M. F. Moreau, M. F. Basle, M. Audran, D. Chappard.  
Osteoporosis International. (Vol.15) 2004: 814-819.

### **Odontologie et prise en charge des défauts maxillo-faciaux.**

D. Maurice, O. André, X. Ravalec, **E. Lerouxel**, M. Ygitoglu, M.C. Augier.  
Les cahiers de prothèse. N°120, Décembre 2002.

## Communications orales

### **Effects of high-doses of ionizing radiations on bone: a rat histological study.**

**E. Lerouxel**, A. Moreau, B. Giumelli, P. Corre, P. Weiss, O. Malard.

ESB, 20<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Nantes, France, September 2006.

### **Increasing role of conventional and engineered Biomaterials in head and neck surgery.**

O. Malard, P. Corre, F. Jégoux, P. Bordure, A. Moreau, **E. Lerouxel**, P. Weiss, G. Daculsi.

ESB, 20<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Nantes, France, September 2006.

### **Substitut Osseux Injectable en territoire irradié et intérêt d'une greffe de moelle osseuse.**

**E. Lerouxel**, O. Malard, J.M. Bouler, J. Guicheux, P. Weiss, P. Corre, G. Daculsi, B. Giumelli.

ADF, Forum des Jeunes chercheurs, Paris, Novembre 2005.

### **Bone marrow autograft associated to Injectable Bone Substitute for bone substitution in an animal model of sequels of radiotherapy.**

**E. Lerouxel**, O. Malard, J.M. Bouler, B. Giumelli, J. Guicheux, P. Weiss, P. Corre, G. Daculsi.

ESB, 19<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Sorrento, Italy, September 2005.

### **Substitut Osseux Injectable en territoire irradié et intérêt d'une greffe de moelle osseuse.**

**E. Lerouxel**, O. Malard, J.M. Bouler, J. Guicheux, P. Weiss, P. Corre, G. Daculsi, B. Giumelli.

Forum des doctorants, Nantes, Juin 2005.

## Communications affichées

### **Porosity of Biphasic Calcium Phosphate (BCP) for bone substitution in an animal model of bone defect as a parameter of cell permeability.**

O. Malard, H. Gautier, **E. Lerouxel**, P. Corre, G. Daculsi

ESB, 20<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Nantes, France, September 2006.

### **Angiogenesis and early histological events during new-bone formation in irradiated bone defects: role of a Bone Marrow (BM) autograft associated to Macroporous Biphasic Calcium Phosphate (MBCP) for bone tissue engineering.**

O. Malard, G. Daculsi, P. Corre, A. Moreau, **E. Lerouxel**, J.M. Bouler, J. Guicheux, P. Layrolle.

ESB, 19<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, Sorrento, Italy, September 2005.

## **TITRE, RESUME ET MOTS CLES FRANÇAIS**

### **Phosphates de Calcium et cellules autologues : base d'une ingénierie tissulaire pour la reconstruction osseuse en territoire irradié.**

Le traitement des cancers cervico-faciaux requiert souvent une chirurgie mutilante et une radiothérapie complémentaire. Ces traitements induisent des séquelles notables au niveau de la sphère oro-faciale. L'exérèse tumorale en terrain irradié ou la résection d'ostéoradionécrose (ORN) pose le problème des difficultés pour la réparation osseuse. Les capacités de cicatrisation sont réduites après extraction dentaire ou mise en place d'implants. En l'absence d'irradiation, les Phosphates de Calcium (PCa) sont couramment utilisés comme substituts osseux en chirurgie oro-faciale.

Ce travail a eu pour but d'évaluer l'association de PCa, sous forme de granules ou injectable, à une greffe de cellules autologues, soit de moelle osseuse totale (MO) soit de cellules souches mésenchymateuses (CSM), en terrain irradié. Un nouveau modèle animal d'ORN localisée a pour cela été développé au préalable.

Le matériau s'est révélé biotoléré bien que faiblement ostéointégré en terrain irradié. La greffe de MO a significativement amélioré la repousse osseuse. L'adjonction de CSM, issues de MO ou du tissu adipeux, au matériau n'a pas apporté d'amélioration de la repousse osseuse. Ces résultats peuvent s'expliquer par la richesse de la MO en cellules et facteurs de croissance indispensables à la réparation osseuse.

Ce travail permet d'envisager l'intérêt de comblements osseux par des PCa associés à une greffe de MO en terrain irradié. Des études ultérieures auront pour objectif d'évaluer le devenir et le rôle des cellules implantées dans les phénomènes d'ostéogenèse et d'angiogenèse. Ce travail permet aussi d'entrevoir une perspective thérapeutique dans l'ORN grâce à l'ingénierie tissulaire osseuse.

**MOTS CLES :** Cancer de la Tête et du Cou, Radiothérapie, Moelle Osseuse, Greffe osseuse, Biomatériaux, Céramique Phosphocalcique, Substitut Osseux Injectable, Cellules Souches Mésenchymateuses, Ostéoradionécrose.



## TITRE, RESUME ET MOTS CLES ANGLAIS

### **Calcium Phosphates and autologous cells: tissue engineered materials for bone reconstruction in irradiated areas.**

Treatment of most forms of squamous cell carcinoma requires surgical procedures and high-dose irradiation, which often produce major esthetic and functional injuries in the maxillofacial area. Radiotherapy produces irreversible side-effects on bone, involving damages to its reparation properties and complications such as infections, healing delays and osteoradionecrosis (ORN). Synthetic biphasic Calcium Phosphates (CaP) have been used extensively as bone substitutes in maxillofacial and dental applications as alternatives to autologous bone without irradiation.

The aim of this rat study was to determine the influence on osseous repair of autologous cells grafts, bone marrow (BM) or mesenchymal stem cells (MSC), added to CaP ceramics, used as granules or injectable form, in previously irradiated bone. The development of an animal model of localized ORN has been previously developed.

Ceramics were biotolerated, yet with low osteoconductive properties in irradiated bone. The BM grafts led to a significant increase in bone ingrowth in the irradiated areas. BM or adipose tissue derived MSC were not able to enhance bone ingrowth in irradiated osseous defects. These results could be explained by BM resources in cells and in growth factors indispensable for osseous repair.

These results allow to highlight the interest of bone substitution by association of CaP ceramics and BM grafts in irradiated bone. Further studies will have to assess the role of grafted cells in osteogenesis and neoangiogenesis. This study allows also to foresee ORN treatment with tissue engineered materials.

**KEY WORDS :** Head and Neck Cancer, Radiation Therapy, Bone Marrow, Bone Graft, Biomaterials, Calcium Phosphate Substitute, Injectable Bone Substitute, Mesenchymal Stem Cells, Osteoradionecrosis.