

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DES FRACTURES CHEZ LA SOURIS IRRADIÉE A L'AIDE DES MARQUEURS FLUORESCENTS

R. DELOINCE *, J. CASTANET** et J. DROUET *

(Manuscrit reçu le 7 juin 1972)

RÉSUMÉ

La réparation de la fracture tibiale de souris adultes, témoins et irradiées, est étudiée par les techniques de marquages fluorescents, révélant l'ostéogénèse en cours (phase de minéralisation). Une irradiation de l'organisme entier par les Rayons X à la dose de 597 R, pratiquée immédiatement après la fracture expérimentale, retarde de huit jours cette réparation.

SUMMARY

The healing of the tibia fracture in adult mice (irradiated; controls) is studied by the fluorescent markers technic which reveals the osteogenesis in progress (mineralization phase). Total body radiation by X-rays (597 R), practised immediately after the experimental fracture delays the healing for about 8 days.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Heilung von Schienbeinfrakturen erwachsener Mäuse (bestrahlte, Kontrolltiere) wird mit Hilfe der Technik der fluoreszierenden Indikatoren untersucht, die die in Entwicklung befindliche Knochenbildung (Mineralisationsphase) anzeigt. Eine Ganzkörperbestrahlung (597 R), sofort nach der Versuchsfraktur ausgeführt, verzögert diese Heilung um 8 Tage.

INTRODUCTION

Depuis les travaux de DUHAMEL en 1741 [9], la réparation des fractures expérimentales fait l'objet d'études ininterrompues [5, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 21, 22]. Divers problèmes subsistent; on peut toutefois considérer les phases anatomiques de la réparation comme bien établies. En revanche, l'étude de l'évolution d'une fracture après irradiation globale de l'animal reste fragmentaire [1, 2, 3, 4, 10, 23].

* Division de Biologie-Écologie - C.R.S.S.A. - rue du Lt. R. Batany, 92 - Clamart.

** Equipe de recherche sur les formations squelettiques. Anatomie comparée Faculté des Sciences, 7, quai St-Bernard, 75000 PARIS.

Le présent travail a pour but d'apprécier la succession chronologique des différentes phases de la reconstruction d'une fracture chez l'animal irradié grâce à l'utilisation des marqueurs fluorescents [6, 8, 17]. Son fondement méthodologique appartient au travail de COUTELIER [5].

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Pour des raisons circonstancielles nous avons utilisé des souris — souche C 17 — âgées de 8 mois, d'un poids moyen de 20 grammes.

La fracture de la diaphyse tibiale gauche réalisée manuellement évolue ensuite sans réduction ni contention. Les conditions expérimentales entraînent des complications gênant la réparation.

Les souris sont réparties en deux lots de 40 — celles du premier lot ne subissent qu'une fracture et constituent nos témoins. Celles du second lot sont irradiées de 1 à 7 minutes après la fracture.

Conditions d'irradiation : Générateur de rayons X de marque SIEMENS — Dose d'irradiation : 597 R — Débit de dose 89 R/mn — 220 kV — 15 mA — Filtre en cuivre de 0,5 mm — Distance foyer animal 42 cm — Contrôle de la dose par chambre Victoreen.

Marquage : nous avons associé le chlorhydrate de tétracycline en solution stérile et l'alizarine rouge S [7]. Cette dernière, inhibant à la concentration utilisée l'ostéogénèse, sera employée comme marqueur terminal. Les injections se font par voie intrapéritonéale à la dose de 50 mg/kg de poids de l'animal pour chacun des marqueurs. Chaque lot de souris reçoit sa première injection le lendemain du sacrifice du lot précédent (sauf entre 2 et 3) de façon à suivre de manière continue la réparation.

Préparation et examen : le sacrifice des animaux et le prélèvement des pièces a lieu systématiquement 6 heures après la dernière injection (alizarine). Les tibias fracturés sont fixés et déshydratés dans l'alcool à 100° par deux bains successifs de 24 heures chacun, puis inclus en résine stratyl suivant la technique de MATRAJT, BORDIER et coll. [15]. Les blocs sont débités à la scie diamantée en lames minces de 100 μ m d'épaisseur, amincies à 60 μ m puis polies sur les deux faces.

Pour l'examen en fluorescence nous utilisons le microscope Orthoplan Leitz avec une lampe HBO, un filtre d'excitation BG 12 (ou UG 1) couplé avec le filtre d'arrêt K. 510.

Les historadiographies ont été effectuées avec un tube à rayons X à foyer fin (0,3 mm) et fenêtre en béryllium, en appliquant les constantes suivantes : 20 kV, 5 mA, distance foyer-objet : 20 cm, pendant 40 minutes. Emulsion sur plaque de verre type HR Kodak.

RÉSULTATS

Par convention le jour du (des) traumatisme (s) est noté J. Les injections de substances fluorescentes sont réalisées à J + N (N étant exprimé en jours). La fluorescence de l'ossification tibiale épiphysaire (articulation tibio-fémorale) nous servira au long de ce travail comme preuve d'un marquage satisfaisant.

Lot N° 1 : Injection de tétracycline à $J + 1$.

Souris témoins : au niveau de la fracture, en périphérie des fragments, il existe une légère fluorescence qui témoigne probablement de la présence de sang extravasé [5].

Quelques ostéoplastes sont fluorescents.

Souris irradiées : aspect identique à celui des souris témoins.

Lot N° 2 : Injections : tétracycline à $J + 2$; alizarine à $J + 3$.

Souris témoins (fig. 1 a) : au niveau de la fracture on observe une importante réaction œdémateuse. De nombreuses taches fluorescentes signalent l'hématome.

L'extrémité des fragments fracturés est irrégulière et ne présente ici aucune fluorescence ce qui indique l'absence d'ostéogénèse.

Les ostéoplastes à proximité du foyer sont presque tous fluorescents.

A distance du foyer, une double marque fluorescente — jaune et rouge — signale une réaction ostéogénique sous-périostée.

Contre la face endostéale de la diaphyse, à proximité du foyer de fracture, on retrouve une marque bicolore. Elle s'amincit et disparaît dès que l'on s'éloigne du foyer.

Par ces images, nous saisissons les premiers stades de l'ostéogénèse réparatrice. Elle s'établit donc vers la 48^e heure après la fracture conformément aux travaux de COUTELIER effectués sur la côte du lapin.

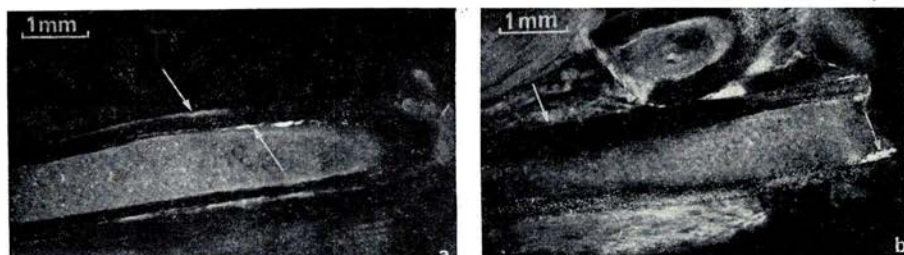


FIG. 1. — Tétracycline : $J + 2$; Alizarine : $J + 3$.

a) Animal témoin : première manifestation de l'ostéogénèse sous-périostique et endostéale (marques jaune et rouge adjacentes) (flèches). La coupe tangentielle ne permet pas de voir l'extrémité anguleuse des fragments. b) Animal irradié : la tétracycline met en évidence le tout début de l'ostéogénèse sous-périostique et endostéale (flèches). Pas de marque rouge. Nette fluorescence des ostéocytes.

Souris irradiées (fig. 1 b) : la présence de quelques rares plages fluorescentes au voisinage de la région fracturée signale probablement l'hématome. Les extrémités fracturées sont irrégulières. A distance du foyer prend naissance en périphérie de la virole diaphysaire une fine bande fluorescente jaune qui n'est jamais surmontée d'une bande rouge. Sur la face endostéale près du trait de fracture on devine une mince ligne fluorescente jaune.

A ce stade, nous constatons les premiers effets de l'irradiation sur l'ostéogénèse réparatrice d'une fracture. Commencée normalement comme sur l'animal témoin, celle-ci est pratiquement bloquée à partir de la 48^e heure suivant l'irradiation.

Lot N° 3 : Injections : tétracycline à $J + 5$; alizarine à $J + 9$.

Souris témoins (fig. 2 a et c) : l'ostéogénèse périostée, en pleine extension, forme maintenant un cal osseux qui « pousse » en direction du foyer de fracture. Certaines travées de ce cal ont une double marque jaune et rouge en périphérie. C'est la preuve de leur épaissement continu.

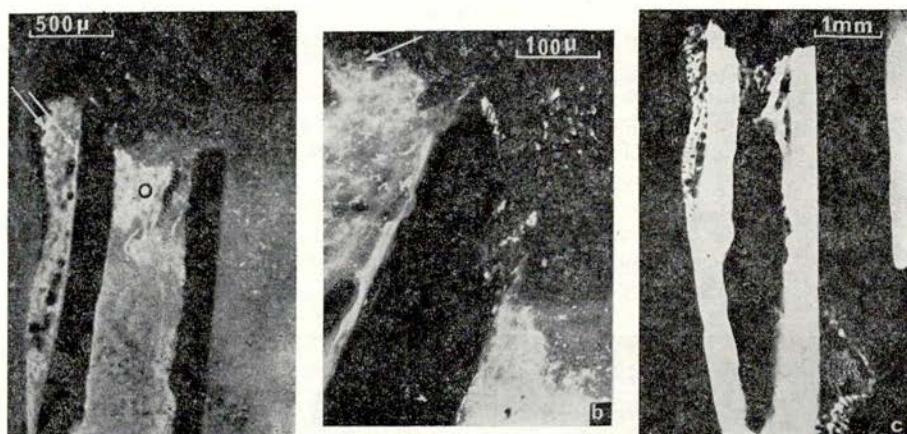


FIG. 2. — Tétracycline : $J + 5$; Alizarine : $J + 9$ - Animal témoin seulement.

a) Une double marque jaune et rouge (flèches) montre la progression de la virole osseuse périostique; du fait du chevauchement, ce manchon n'est pas symétrique sur toute la périphérie diaphysaire (voir § c). Ostéogénèse intramédullaire (cercle). b) Ossification endochondrale au niveau du foyer de fracture (flèche). c) Microradiographie.

Le cal cartilagineux est bien visible au niveau de la fracture. Il sera ensuite le siège d'une ossification enchondrale (fig. 2 b).

L'ostéogénèse intra-médullaire est nette.

Souris irradiées : aucun foyer d'ostéogénèse n'est décelable au niveau de la fracture (absence de fluorescence). Cependant, par endroits, contre la diaphyse, quelques marques rouges signalent la reprise imminente de l'ossification. Le stade suivant confirmera cette observation.

Lot N° 4 : Injections : tétracycline à $J + 10$; alizarine à $J + 19$.

Souris témoins (fig. 3 a) : les viroles d'os périostique de chaque fragment viennent au contact.

Les bourrelets de cal sous-jacents se rejoignent en de nombreux points. La fluorescence rouge, très importante à ce niveau, indique que la formation et l'épaississement des travées osseuses se poursuit. Cependant, une certaine diffusion parasite de l'alizarine [5] modifie probablement cet aspect.

L'extrémité des fragments osseux a un aspect émoussé et, localement, on discerne un début d'érosion.

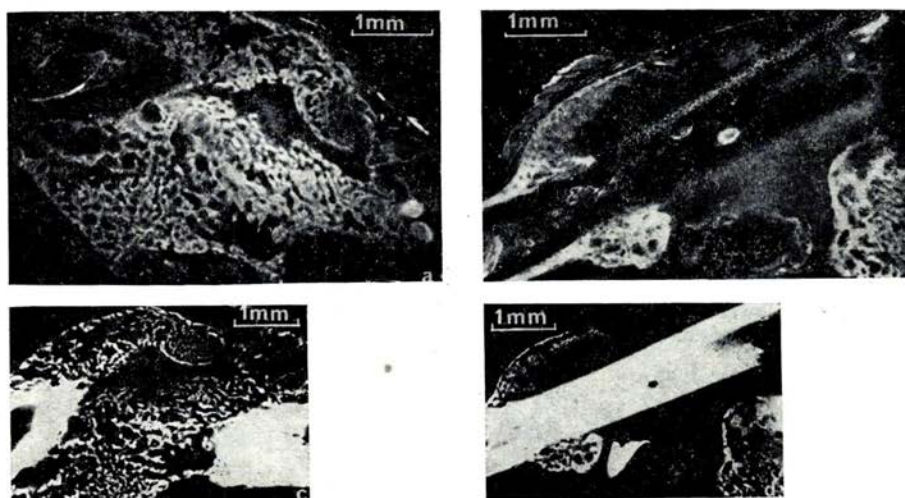


FIG. 3. — Tétracycline : J + 10; Alizarine : J + 19.

a) Animal témoin : soudure des deux manchons osseux. b) Animal irradié : prolifération du cal osseux, engagée avec un retard de 8 jours sur le témoin. Stade à peine plus évolué que celui représenté sur la figure 2 a, c et d : historadiographie de 3 a et 3 b.

Souris irradiées (fig. 3 b) : globalement l'image obtenue est superposable à celle fournie par la souris témoin du lot N° 3.

La fluorescence jaune se retrouve essentiellement contre la diaphyse. Le reste de la virole osseuse périostique, par sa fluorescence rouge, montre que la réparation de la fracture irradiée, une fois commencée, semble se poursuivre normalement.

La prolifération des bourrelets révèle maintenant une ostéogénèse active.

L'ossification intramédullaire est nette. On remarque les extrémités encore irrégulières des fragments osseux.

Nous saisissons à ce stade la reprise de l'ostéogénèse signalée sur les souris irradiées du lot N° 3. Elle est ici marquée en jaune.

Pour les souris témoins et irradiées, l'historadiographie (fig. 3 c et d) donne une image de la calcification, superposable à celle obtenue en fluorescence.

Ainsi l'ostéogénèse réparatrice de la fracture irradiée bloquée au deuxième jour (48^e heure), s'amorce de nouveau dix jours après le double traumatisme. Le décalage enregistré, c'est-à-dire le retard pris sur la réparation des fractures témoins, est donc, dans nos conditions d'expérimentation, de 8 jours.

Lot N° 5 : Injection : tétracycline à $J + 20$; alizarine à $J + 30$.

Souris témoins (fig. 4 a) : la réparation de la fracture est en voie d'achèvement.

L'ossification enchondrale est terminée. Les fragments sont maintenant bien unis par un manchon de cal homogène dont les travées se sont encore épaissies. Son diamètre général tend à se réduire : une légère fluorescence jaune marque en effet la fin du dépôt — vers le 22^e jour — de la virole osseuse périostique. Elle n'est pas surmontée d'une marque rouge.

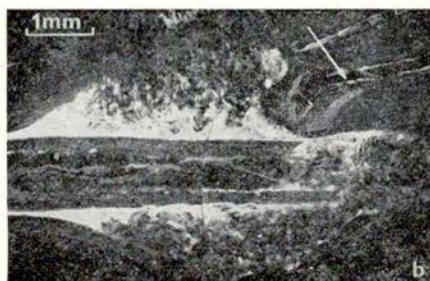


FIG. 4. — Tétracycline : $J + 20$; Alizarine : $J + 30$.

a) Animal témoin : les travées du cal sont très épaissies et remaniées. La virole osseuse périostique est encore bien individualisée (flèche). Chevauchement et angulation marqués. b) Animal irradié : stade comparable à celui de la figure 3 a. Un des fragments (flèche) traverse tangentiellement le plan de la préparation ce qui rend la soudure osseuse peu évidente sur ce cliché.

Souris irradiées (fig. 4 b) : la reconstruction osseuse se poursuit. L'ossification se trouve à un stade équivalent à celui des souris témoins du lot précédent. Le retard accumulé par la fracture irradiée — 8 jours — semble donc maintenu.

DISCUSSION

Conformément aux travaux antérieurs [5, 7], nous admettons que la tétracycline et l'alizarine révèlent l'ostéogénèse en cours, au moment de sa calcification, ainsi que les échanges minéraux au niveau des ostéoplastes et de l'hématome. De ce fait, cette technique semblait particulièrement indiquée pour apprécier et comparer l'évolution d'une fracture chez les animaux témoins et irradiés.

Notre expérimentation se limite au premier mois de la réparation et ne permet pas d'étudier la complète consolidation de la fracture.

Ainsi que SPITTLER [19], nous constatons un retard dans la réparation des fractures irradiées. Dans nos conditions expérimentales, nous l'évaluons à 8 jours. Les travaux de SPITTLER chez le rat [19] ont montré que ce retard est proportionnel à la dose reçue. On peut signaler d'autre part les conclusions de H.Q. WOODWARD [23] qui estime que « l'effet de l'irradiation avant la fracture est deux fois plus important qu'après la fracture ». Le retard enregistré serait également différent dans le cas d'une irradiation locale, pour des animaux jeunes ou séniles. L'étude comparative détaillée de tous ces facteurs devrait être féconde. Dans les deux lots de souris, nous constatons une ostéogénèse sous-périostée vers la 48^e heure, qui se poursuit sans interruption chez les témoins. En revanche, chez nos animaux irradiés, elle se bloque à ce moment pour ne reprendre que 8 jours plus tard. L'action de l'irradiation sur le périoste stimulé dont les cellules — selon TONNA et KONKRITE [20] — entrent en division vers la 16^e heure après la fracture, pourrait être une des causes de ce retard. La microscopie électronique et les marquages cellulaires isotopiques semblent des techniques de choix pour tenter de confirmer cette hypothèse. Dans le cadre de notre étude, l'ostéogénèse chez les animaux irradiés apparaît normale. La minéralisation de l'os néoformé semble identique — comme le montrent les historadiographies — à celle des animaux témoins. En outre, le retard acquis par les souris irradiées demeure jusqu'à la consolidation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BONARIGO B.C., RUBIN P. Nonunion of Pathologic Fracture after Radiation Therapy. *Radiology*, **88**, N° 2, pp. 889-898, 1967.
- [2] BONFIGLIO M. The Pathology of Fracture of the femoral neck following irradiation. *Am. J. Roentg.*, **70**, N° 3, pp. 449-459, 1953.
- [3] BURES M.F., WUCHERMANN A.H. Bone Remodeling Dynamics Local X Irradiation. *J. Dent. Res.*, **48**, N° 3, pp. 376-384, 1969.
- [4] CLUZET M. Action des Rayons X sur le développement du cal. (Étude macroscopique et radiographique). *Lyon Médical*, **42**, pp. 22-24, 1910.
- [5] COUTELIER L. *Recherches sur la guérison des fractures*. Bruxelles, Arscia, Paris, Maloine, 1969.
- [6] COUTELIER L., DHEM A., VINCENT A. La Microscopie de fluorescence dans l'étude de l'ossification enchondrale. *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.*, 7^e Série, pp. 675-689, 1963.
- [7] DHEM A. *Le remaniement de l'os adulte*. Bruxelles, Arscia, Paris, Maloine, 1967.
- [8] DUHAMEL H.L. Sur une racine qui a la faculté de teindre en rouge les os des animaux vivants. *Med. Acad. Roy. Sc.*, **52**, pp. 1-13, 1739.
- [9] DUHAMEL H.L. Observations sur la réunion des fractures des os. Premier Mémoire, *Med. Acad. Roy. Sc.*, **54**, pp. 97-112, 1741.
- [10] GREEN N., FRENCH S., RODRIGUEZ G., HAYS M., FINGERHUT A. Radiation Induced Delayed Union of Fracture. *Radiology*, **93**, N° 3, pp. 635-641, 1969.
- [11] JARRY L., UHTHOFF M.K. Differences in healing of metaphyseal and diaphyseal fractures. *Canadian Journal of Surgery*, **14**, pp. 127-135, March 1971.
- [12] LACROIX P. *L'organisation des os*. Paris, Masson, 1949.
- [13] LACROIX P. Sur la réparation des fractures. Les mécanismes locaux. *C.R. 15^e Congrès Soc. Intern. Chir.*, pp. 553-563, 1953.
- [14] LACROIX P. Les mécanismes locaux de la guérison des fractures. *Acta. Chir. Belg.*, **69**, 1970.
- [15] MATRAJT M., BORDIER P., MARTIN J., MIOCO D. Technique pour l'inclusion des biopsies osseuses non décalcifiées. *J. of Microscopy*, **6**, N° 4, pp. 499-504, 1967.
- [16] McLEAN F.C., URIST M.R. *Bone - Fundamentals of the physiology of skeletal tissue*. 3^e éd. revue et élargie. Chicago. The Univ. of Chicago Press, 1968.
- [17] MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E. Bone localisation of the tetracycline. *J. Nat. Cancer Inst.*, **19**, pp. 87-93, 1957.

- [18] PRITCHARD J.J. Histology of fracture repair in : Clark J.M.P. (ed.). *Modern Trends in Orthopaedics*, **4**, pp. 64-90, London, Butterworths, 1964.
- [19] SPITTLER A.W., BATCH J.W., RUTLEDGE B.A. Whole body irradiation on the healing of fresh fractures. *A.M.A. Archives of Surgery*, **68**, pp. 93-104, 1954.
- [20] TONNA E.A., CONKRITE E.P. Cellular response to fracture studied with tritiated thymidine. *J. Bone Joint. Surg.*, **43 A**, pp. 352-362, 1961.
- [21] TRUETA J. Nonunion of fractures. *Clin. Orthop.*, **43**, pp. 23-35, 1967.
- [22] URIST M.R., McLEAN F.C. Calcification and ossification. I. Calcification in the Callus in healing fractures in normal rats. *The Journal of bone and Joint Surgery*, **23**, N° 1, pp. 1-16, 1941.
- [23] WOODARD H.Q. *The influence of X.Rays on the healing of fracture*. Health Physics, Pergamon Press, **19**, pp. 791-799, 1970.