

Étude des effets induits sur la cornée *in vivo* et *in vitro* par le rayonnement laser émis à 1,57 μm

T. Marrel, C. Pothier, D. Courant,
N. Salès et C. Chapel

CEA - DSV / DRR & DRM Fontenay aux roses
DGA - DCE / CTA / LOT Arcueil

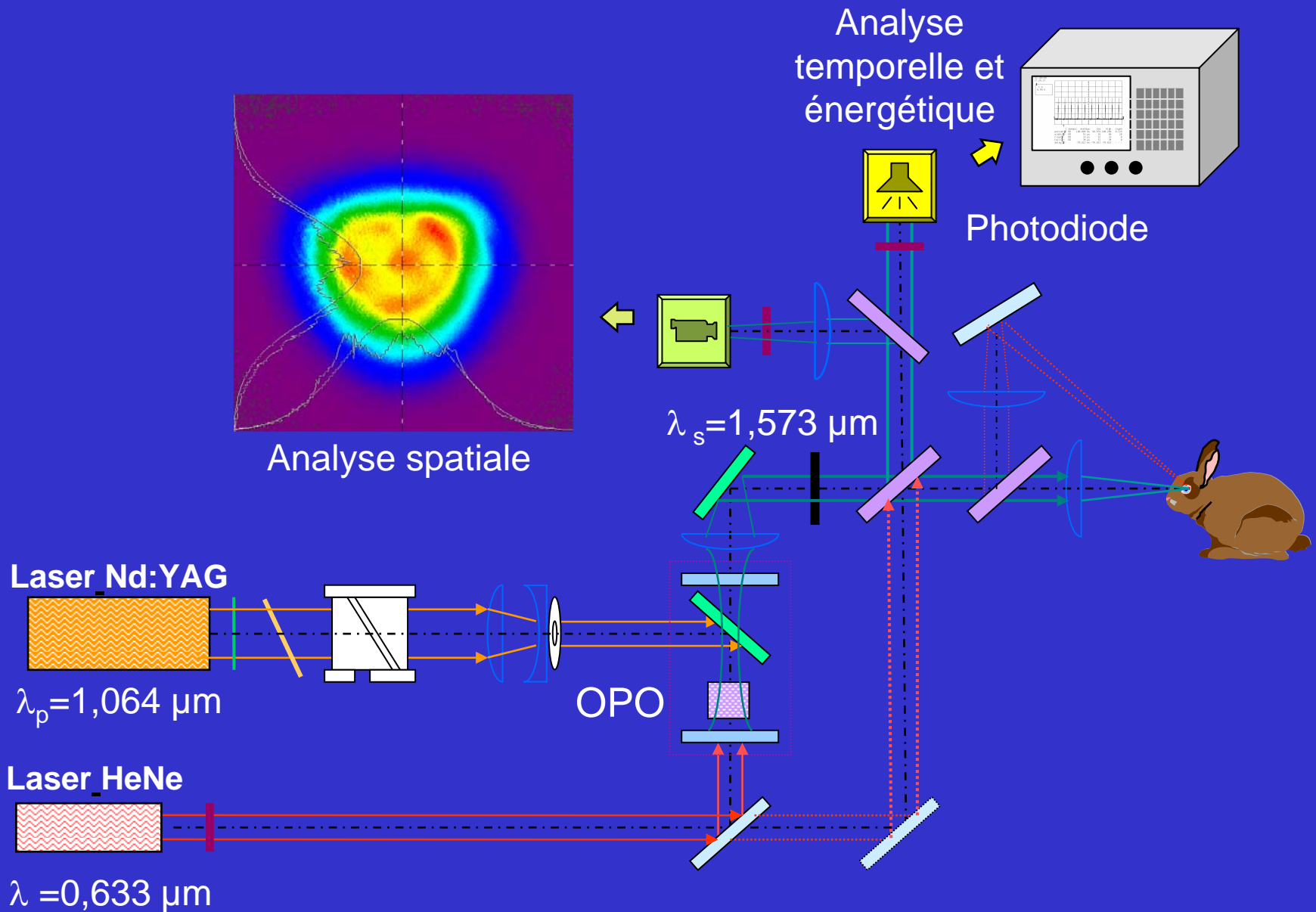
Les rayonnements optiques entre $1,5 \mu\text{m}$ et $1,6 \mu\text{m}$ sont qualifiés de **rayonnements à sécurité oculaire** pour les raisons suivantes :

- Ils ne parviennent pas à la rétine.
- Ils ne sont pas absorbés par le cristallin.
- Ils induisent des dommages à la **cornée** seulement mais à partir d'une énergie élevée.

Les objectifs de cette étude sont de :

- 1) Déterminer *in vivo* le seuil de lésion de la cornée à 1,57 μm et comparer les résultats avec ceux de la littérature et les limites actuelles
- 2) Etudier les techniques *in vitro* permettant d'évaluer les effets cellulaires induits par ce rayonnement infrarouge.

Banc expérimental à 1,57 μm



1. Expérimentations *In vivo*

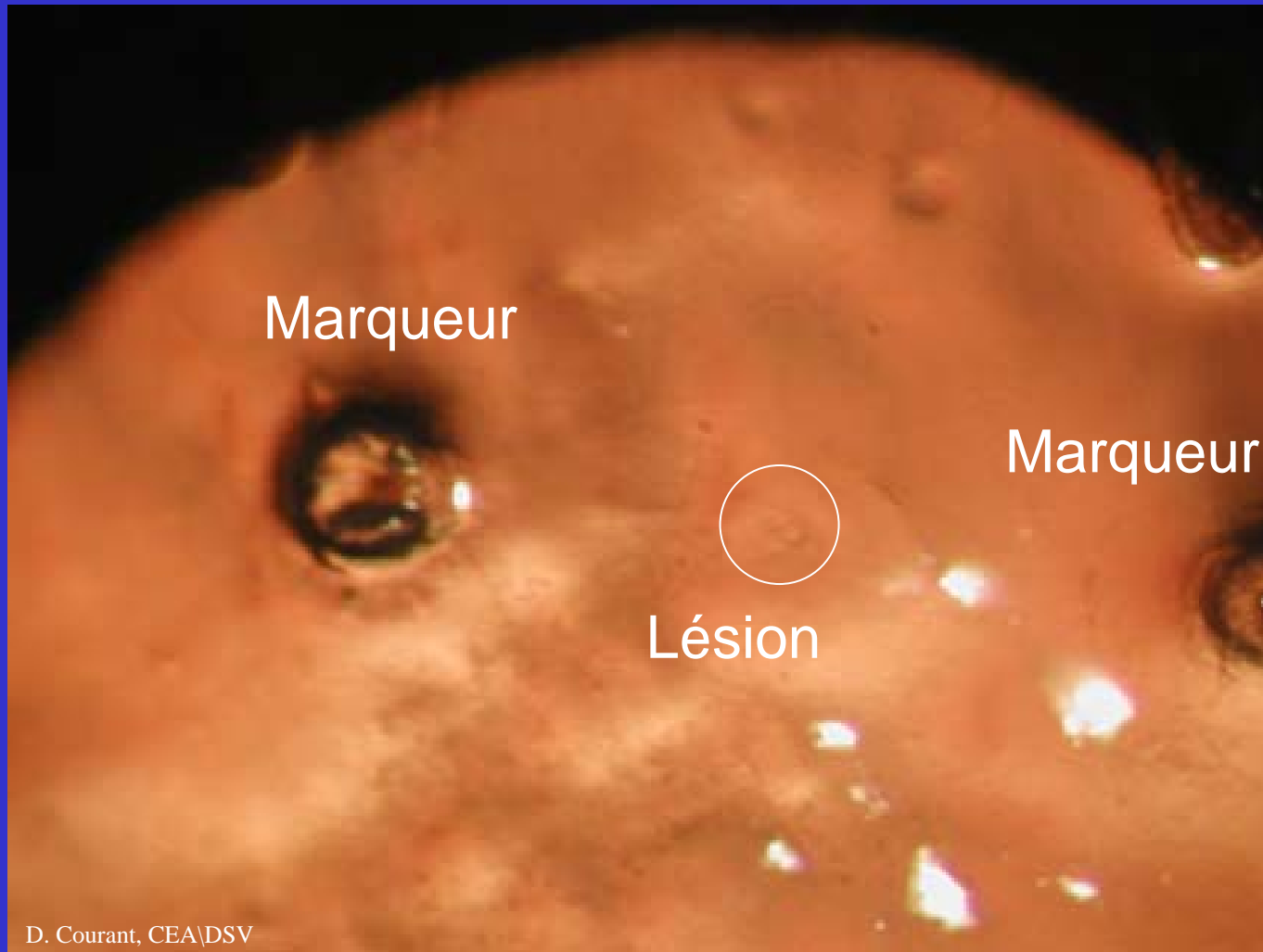
Lapin “ Fauve de Bourgogne “

- Exposition de la cornée à un spot de 574 μm .
- Animal anesthésié par injection intra-musculaire de kétamine hydrochloride (10 mg/kg).
- Pupilles dilatées avant l'exposition au faisceau infra-rouge par instillation de tropicamide (Mydriaticum) afin de faciliter l'observation au microscope chirurgical.
- Anesthésique locale (Novésine) appliqué sur chaque œil.
- Œil maintenu ouvert à l'aide d'un blépharostat et cornée humidifiée avant chaque tir.

Examen ophtalmoscopique

- Utilisation de marqueurs (5 à 10 impulsions, 10 Hz) en raison de difficultés d'observation et de repérage.
- Observation de la zone de dommage après, 30 mn, 24 h, 48 h et 7 jours à l'aide d'un microscope chirurgical.
- Re-épithélialisation observée par instillation d'une solution de fluorescéine à 1%.
- Les traitements et les protocoles utilisés dans cette étude sont conformes aux *European Community Guidelines on Animal Experiments*.

Lésion cornéenne induite par une impulsion unique de 3 ns à 1,57 μm



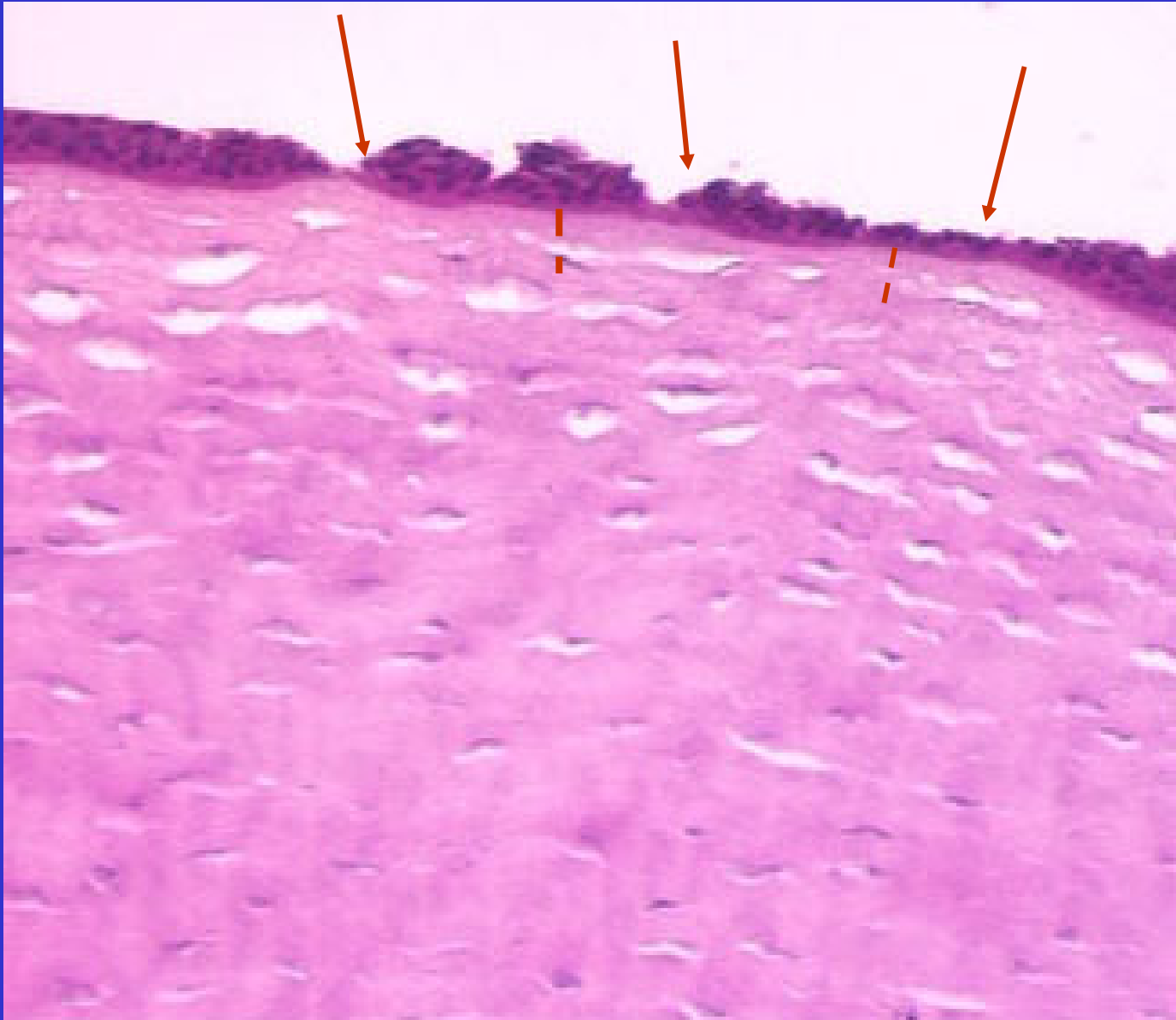
Comparaison des dommages induits à la cornée par le rayonnement laser entre 1,5 et 1,6 μm

λ (μm)	t (s)	\varnothing image (mm)	ED50 ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Référence
1,54	$1\cdot 10^{-3}$	1 - 2	7,2	Avdeef & al 1978
1,54	$9,3\cdot 10^{-4}$	1	9,6	Stuck & al 1981
1,54	$5\cdot 10^{-8}$	1	21,0	Lund & al 1970
1,54	$4\cdot 10^{-8}$	1 - 2	4,7	Avdeef & al 1978
1,57	$3\cdot 10^{-9}$	0,57	14,4 4,7 (*)	Marrel & al 2004

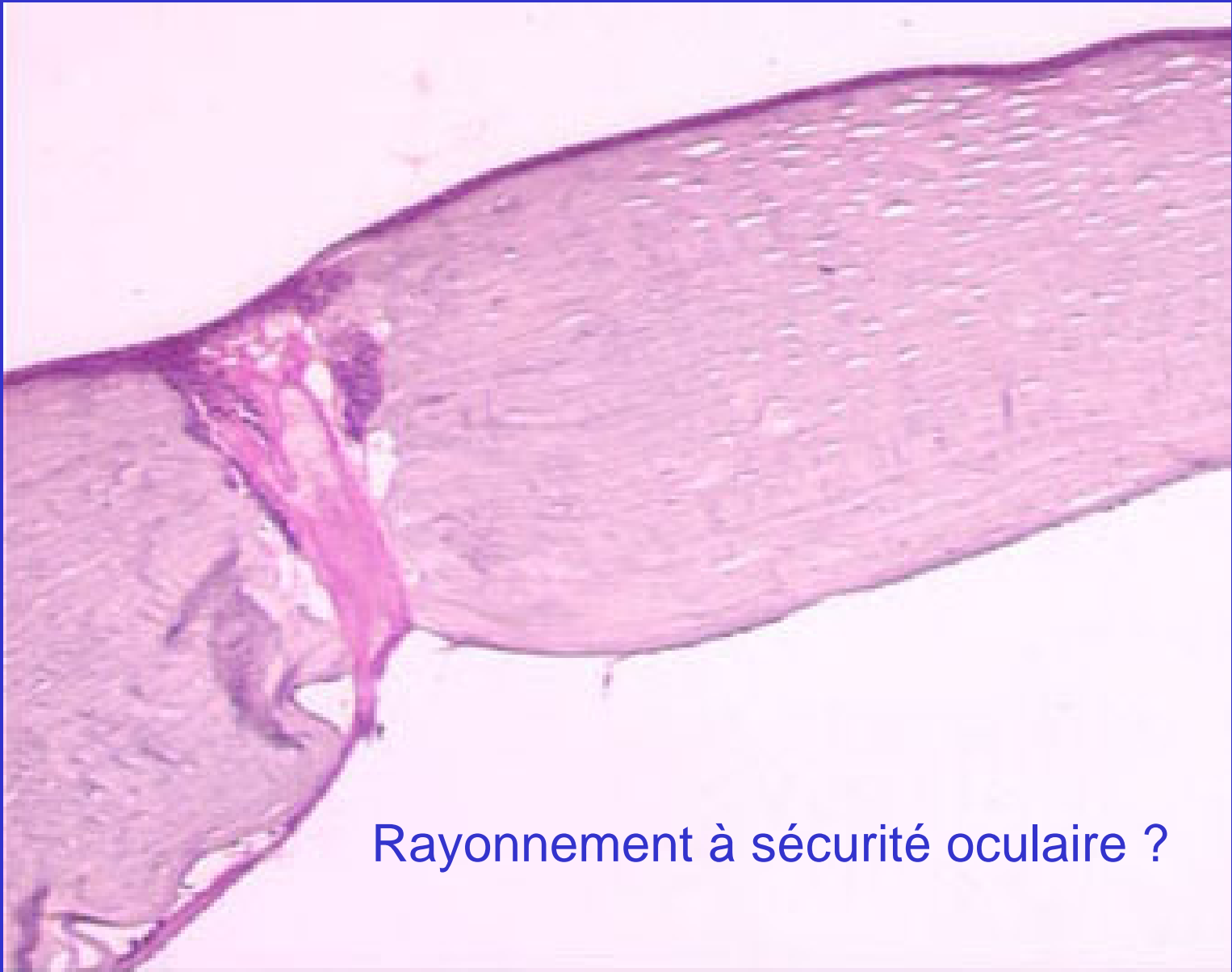
Examen histologique

- 1 h après l'irradiation : les dommages induits par l'impulsion unique concernent la totalité de l'épithélium et une faible partie du stroma.
- Aucune modification observée au niveau de l'endothélium.
- La re-épithélialisation est achevée après 48 h.
- Le dommage induit par une impulsion unique n'est plus détecté 7 jours après l'irradiation.

Impulsion unique d'un laser $1,57\mu\text{m}$, $H = 15,0 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$



Lésion marqueur induite par 5 à 10 impulsions (39 mJ, 3 ns, 10 Hz, 1.57 μm)



Rayonnement à sécurité oculaire ?

2. Expérimentations *In vitro*

Résultats préliminaires

- Agrandissement du diamètre de faisceau à 3,5 mm.
- Irradiation de cultures cellulaires sur supports de type plaque pour culture ou Lab Tek.
- Exposition énergétique maximum :
0,395 J.cm⁻² / impulsion.
- Irradiation des cellules : 1, 2 ou 3 s à 10 Hz,
soit : 3,9 ; 7,9 ou 11,8 J.cm⁻².

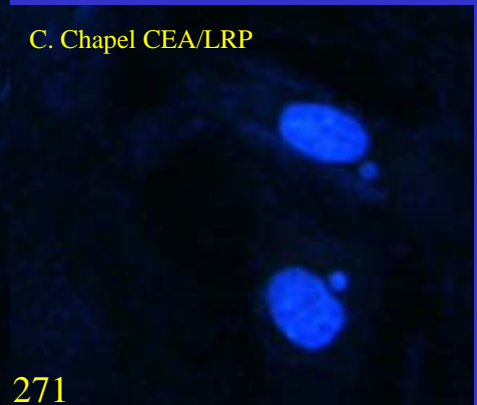
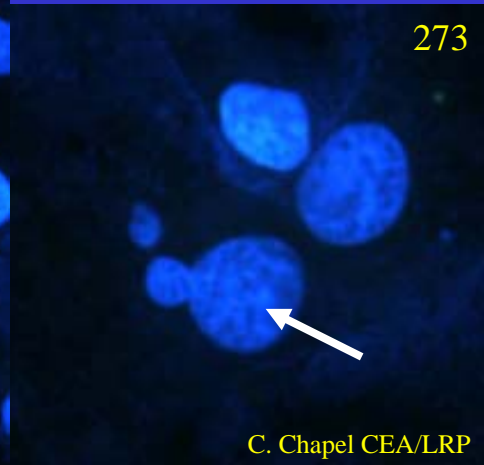
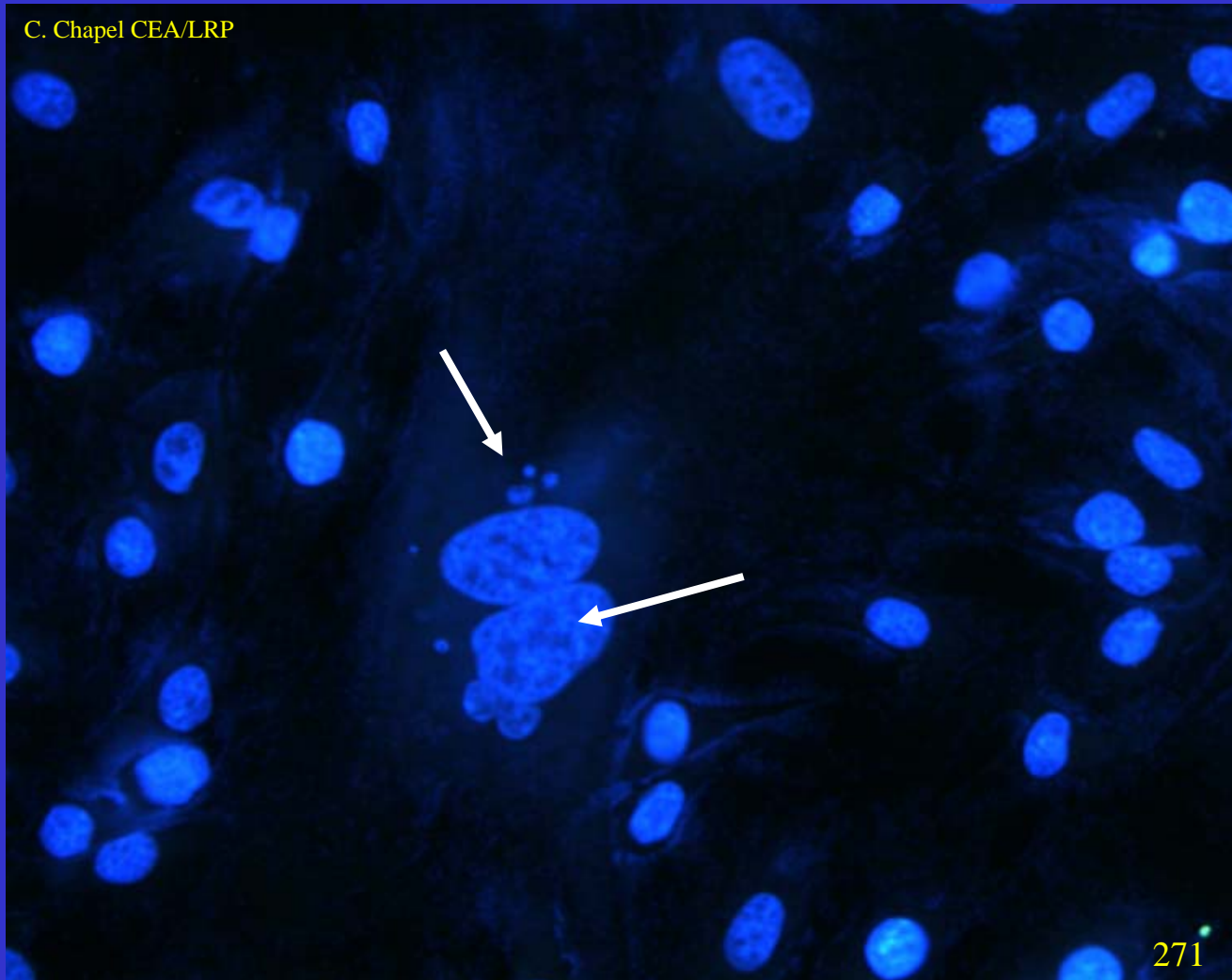
Prolifération cellulaire

- Kératocytes de lapin issus de culture primaire (Long & al, 2000).
- Le rayonnement n'a pas modifié de manière significative la prolifération, mais le nombre important de cellules a pu engendrer un artéfact systématique.

Etude morphologique

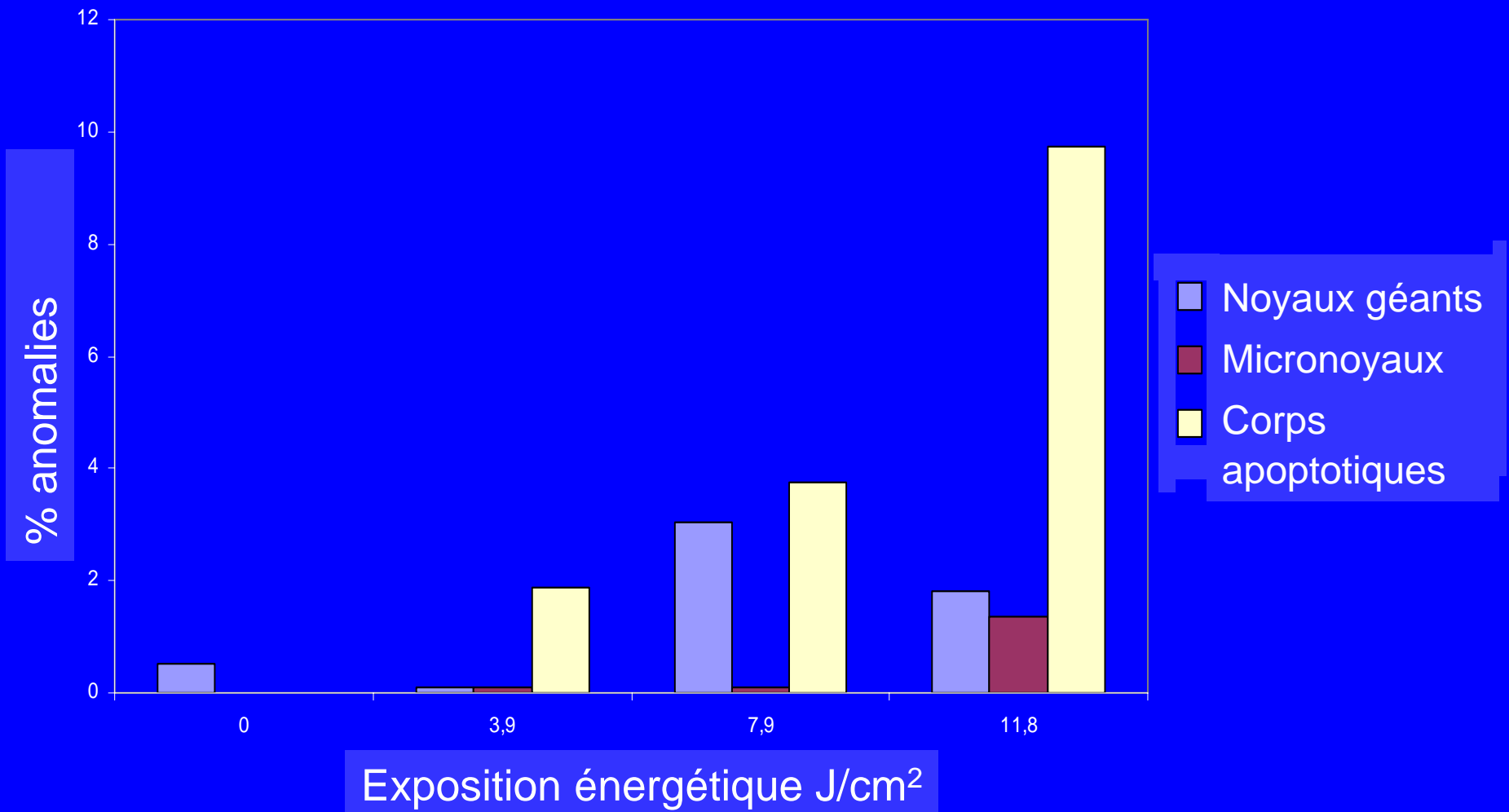
- Kératocytes de lapin issus de culture primaire.
- Cellules épithéliales HT 1080.
- Les cellules sont irradiées sur support Lab Tek.
- Fixation 24 h après irradiation.
- ADN coloré avec solution DAPI.
- Les noyaux sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'une caméra et analysés à l'aide du programme de traitement d'image SPOT Advanced.

Keratocytes irradiés par un train d'impulsions, 2 s, 10 Hz, 7,9 J.cm⁻²

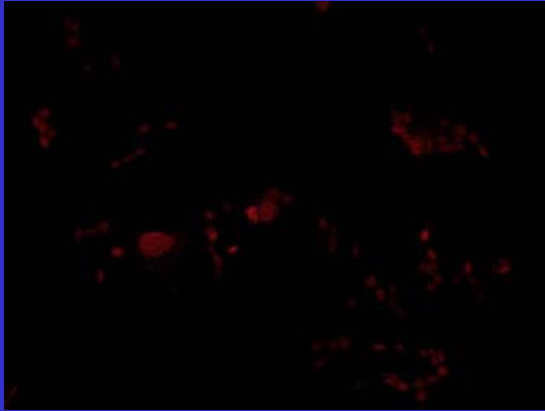


Aberrations nucléaires: Micro-noyaux et corps apoptotiques

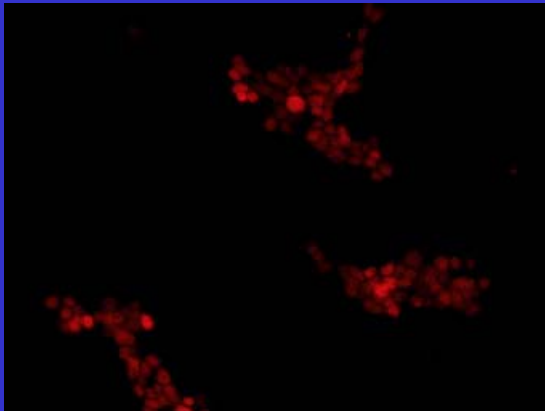
Pourcentage d'anomalies nucléaires induites par une irradiation à 1,57 μm des kératocytes



Régulation du stress cellulaire : induction de la p53

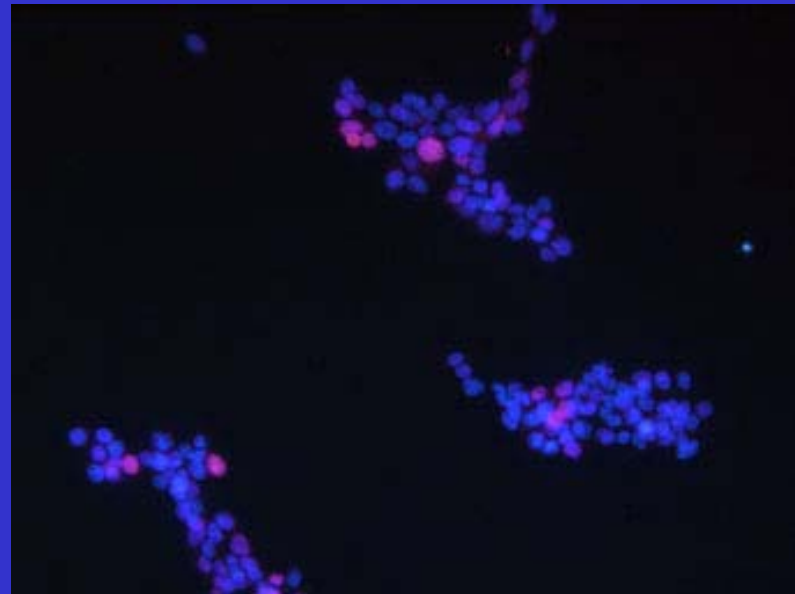


Kératocytes non irradiés
niveau normal de p53



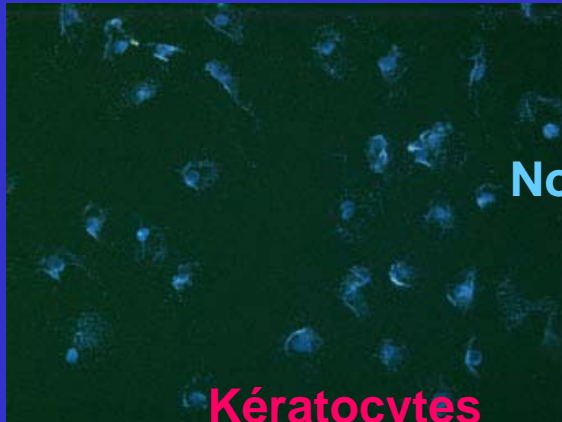
Kératocytes après irradiation
laser (3 s 1,57 μm)

Kératocytes traités avec un anticorps spécifique anti p53 (DO7 de E. May) révélé par une coloration rouge (Texas Red)



Double marquage avec DAPI et Texas Red permet d'effectuer une estimation de l'induction de p53 par le rayonnement à 1,57 μm

Cytotoxicité du rayonnement à 1570 nm



**Kératocytes
non
irradiés**

Noyaux colorés par le DAPI

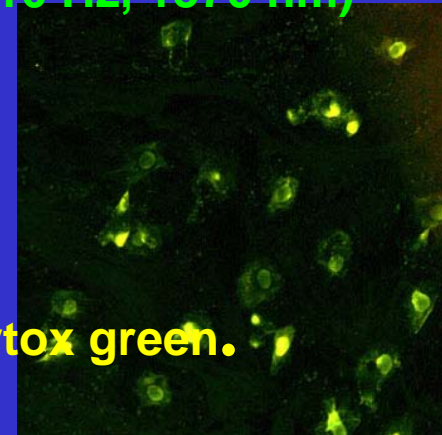


**Kératocytes irradiés
(3 s, 10 Hz, 1570 nm)**

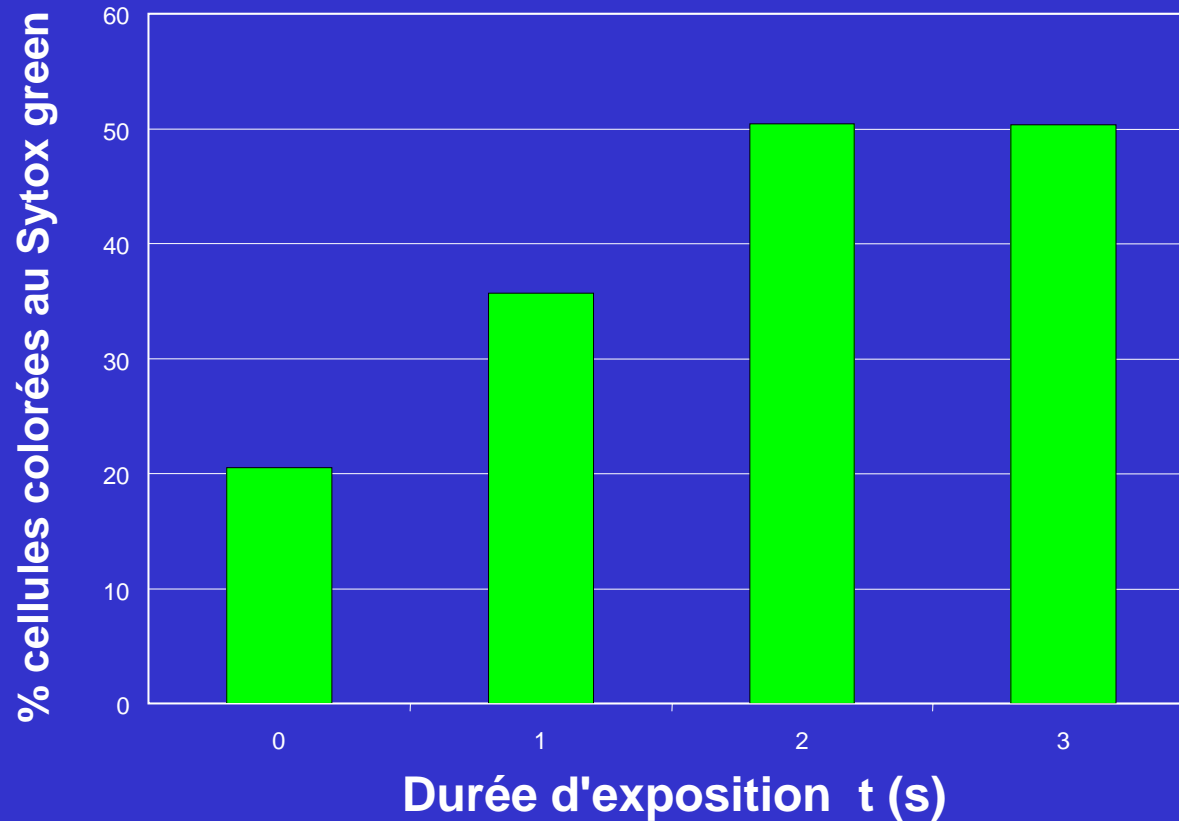


Noyaux des cellules mortes

colorés par le Sytox green.



Cytotoxicité du rayonnement à 1570 nm



Un effet – dose global est observable incluant le phénomène d'apoptose.

Conclusion

In vivo les résultats confirment les rares données de la littérature et la limite actuelle. Cependant :

- la $DE_{50} = 14,4 \text{ J.cm}^{-2}$ est basée sur un critère qui reflète mal la gravité du dommage à la cornée.
- la marge de sécurité est réduite si le calcul utilise la surface minimum de mesure recommandée ($He = 4,7 \text{ J.cm}^{-2}$).
- l'effet cumulatif des impulsions paraît très important.

In vitro les résultats préliminaires ont montré la possibilité d'utiliser des tests spécifiques au niveau cellulaire.

- le rayonnement $1,57\mu\text{m}$ induit un phénomène d'apoptose, confirmé par p53. La fréquence des corps apoptotiques semble l'un des moyens susceptibles d'évaluer le stress cellulaire.