BIOCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE DES ALLIAGES À BASE DE NICKEL ET DE COBALT UTILISÉS EN PROTHÈSE FIXÉE : ÉTUDE IN VITRO

CELL BIOCOMPATIBILITY OF NICKEL AND COBALT ALLOYS USED IN FIXED PROSTHESIS: IN VITRO STUDY

BINATÉ A, TRA BZR, KONATÉ NY, KOUAMÉ KA, BAKOU DO, PESSON DM, DIDIA ELÉ, DJÉRÉDOU KB

Département de prothèse et d'Occlusodontie, UFR d'odonto-stomatologie, Université Félix Houphouët Boigny, 22 BP 612 Abidjan 22

Correspondance : BINATÉ Aboubacar

Assistant Chef de clinique au département de prothèseet d'Occlusodontie, UFR d'odonto-stomatologie, Université Félix Houphouët Boigny

Adresse : 22 BP 612 Abidjan 22 ; Email : ibnat2005@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Introduction : Les alliages à base de nickel et de cobalt sont utilisés pour la réalisation de chapes métalliques ou de couronnes en prothèse fixée. Cependant, leur usage est souvent controversé à cause des effets nocifs qu'ils sont susceptibles d'entrainer en termes de toxicité et de cancérogénicité. Cette étude a pour objectif d'étudier la biocompatibilité cellulaire des alliages à base de Nickel et de Cobalt utilisé en prothèse fixée.

Méthode : Les alliages usinés sous forme de disque de 1 mm de diamètre et 0,2 mm d'épaisseur ont été mis en contact de cellules fibroblastiques de peau humaine de la lignée M 191. L'adhésion et la prolifération cellulaire sur les matériaux ont été étudiées à 3, 6 et 10 jours de culture puis les pièces ont été observées par microcopie électronique à balayage (MEB) à 6 jours de culture.

Résultats : Les cellules fibroblastiques ont adhéré et proliféré à la surface des matériaux. L'adhésion et la prolifération cellulaire paraîssent plus élevées sur les alliages à base de cobalt que sur les alliages à base de nickel.

Discussion : Les tests *in vitro* constituent une étape primordiale dans l'étude de la biocompatibilité cellulaire d'un biomatériau. L'adhésion et la prolifération des fibroblastes sur les matériaux semblent montrer la cytocompatibilité des alliages nickel-chrome et chrome-cobalt. Ces résultats sont en accord avec les observations faites par plusieurs études.

Conclusion : Les alliages à base de nickel et de cobalt semblent présenter une bonne biocompatibilité, avec un avantage pour le Cobalt.

Mots Clés : Biocompatibilité, Nickel, Cobalt, Prothèse Fixée

ABSTRACT

Introduction: *Alloys based on nickel and cobalt are used for the production of metal screeds or fixed prosthesis crowns. However, their use is often controversial because of the harmful effects that they are likely to entail (toxicity and carcinogenicity). The evaluation of the biocompatibility of these alloys is therefore necessary. This study aims to study the cellular biocompatibility of Nickel and Cobalt alloys used in fixed prosthesis.*

Method: *alloys were Machined in disk form 1 mm in diameter and 0.2 mm in thickness were contacted with human skin fibroblastic cells of the M191 line. Adhesion and cell proliferation on the materials were studied at 3, 6 and 10 days of culture then the pieces were observed by scanning electron microcopy (SEM) at 6 days of culture.*

Results: *The fibroblastic cells adhered and proliferated on the surface of the materials. Adhesion and cell proliferation appear to be higher on cobalt-based alloys than on nickel-based alloys.*

Discussion: *In vitro testing is a critical step in the study of the cellular biocompatibility of a biomaterial. Adhesion and proliferation of fibroblasts on materials seem to show the cytocompatibility of nickel-chromium and cobalt-chromium alloys. These results are in agreement with the observations made by several studies.*

Conclusion: *Nickel and cobalt-based alloys appear to have biocompatibility with an advantage for cobalt.*

Key Words: Biocompatibility, Nickel, Cobalt, Fixed Prosthesis

© EDUCI 2019

INTRODUCTION

Les alliages à base de métaux non précieux tels que le nickel ou le cobalt sont utilisés en prothèse fixée pour la réalisation des couronnes et des bridges entièrement métalliques ou des infrastructures des couronnes et des ponts métallo-cosmétiques [1]. Leur utilisation doit répondre à des exigences de biocompatibilité car ils sont placés au contact de la muqueuse buccale pendant une longue période [2]. Or, plusieurs études révèlent des effets nocifs qui sont liés à l'usage des alliages non précieux. Il s'agirait d'hypersensibilité, de toxicité et même de cancérogénicité [3, 4, 5, 6, 7]. Les facteurs généralement incriminés sont la composition des alliages, leur microstructure et leurs propriétés (mécaniques, électrochimiques ou biologiques). A cet effet, de nombreux tests normalisés décrits dans la norme ISO 10993 ont été mis en place pour évaluer la biocompatibilité des alliages. Il s'agit notamment des essais de toxicité générale à court terme, d'hémolyse, de mutagénicité (test d'Ames), de cytotoxicité (*in vitro*, surimposition de gélose, filtre moléculaire), de sensibilisation et d'irritation de la muqueuse buccale. Le choix de ces alliages en odontologie est souvent guidé par leur coût moindre par rapport aux alliages précieux. Mais, face aux risques potentiels auxquels leur utilisation peut conduire chez le patient, l'évaluation de la biocompatibilité de ces alliages s'avère nécessaire. Dans cette perspective, la détermination de la cytocompatibilité *in vitro* sur culture cellulaire paraît être une bonne approche. C'est ce qui justifie la présente étude dont l'objectif est d'évaluer la biocompatibilité des alliages à base de nickel et de cobalt utilisés en prothèse fixée.

1. MÉTHODE

1.1 MATÉRIELS

Les matériaux

Pour cette étude, les matériaux métalliques à base de nickel et chrome usinés par un prothésiste dentaire ont été utilisés. Ils se présentaient sous forme de disque de 1 mm de diamètre et de 0,2 mm d'épaisseur avec une surface polie.

Les cellules

Des Fibroblastes de peau humaine de la lignée cellulaire M191 fournis par un laboratoire de biotechnologie et idéalement conservés ont servi de milieu cellulaire. Ils sont initialement conservés à -196°C (azote liquide) dans des ampoules contenant du sérum de veau fœtal et 10% de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO). Lors de la mise en culture, les fibroblastes sont décongelés à température ambiante.

Le milieu de culture

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec 10% de sérum de veau fœtal. Des antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine) et un antifongique (Mycokill®) sont ajoutés à ce milieu de base afin d'éviter les contaminations bactériennes et fongiques. Les cellules sont cultivées en flasque dans un premier temps. A confluence, les cellules sont repiquées dans des plaques de 24 puits pour effectuer les expériences.

1.2 PARAMÈTRES ÉTUDIÉS

Adhésion cellulaire

Elle concerne la capacité des cellules à adhérer au matériau. Cette étape est importante pour évaluer la toxicité du matériau vis-à-vis des cellules.

Les pièces métalliques ont été placées sur des plaques de cultures de 24 puits. 100 µL de milieu de culture contenant $2,5.10^4$ de fibroblastes ont été déposés à la surface de chaque pièce puis, les plaques ont été incubées dans des conditions standards de culture (37°C, 5% CO2) pendant deux heures. Ensuite, 500 mL de milieu de culture complet ont été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été placées durant 5 mn sous agitation modérée. Ainsi, les cellules non adhérentes ont été entrainées au fond des puits et ne sont pas restées à la surface des disques de matériau. Les échantillons métalliques ont ensuite été transférés dans de nouveaux puits. Chaque puits est complété avec du milieu de culture frais et les plaques ont été incubées 2 heures à l'étuve.

L'opacité des pièces en microscopie optique n'a pas permis d'observer directement les cellules fixées à leur surface. L'observation de cellules non adhérentes réparties au fond des puits donne une indication sur la capacité d'adhésion cellulaire sur les matériaux.

Prolifération et viabilité cellulaires

- Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été évaluée par le test colorimétrique MTT (bromure de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tétrazolium)

 © EDUCI 2019

décrit par Mosmann [8]. Celui-ci est basé sur la réduction du MTT, sel jaune de tétrazolium, par les réductases NADPH mitochondriales des cellules vivantes pour former un produit formazan bleu-violet. La prolifération cellulaire a été évaluée à 3, 6 et 10 jours de culture.

A chaque temps, le surnageant de culture a été aliquoté puis congelé à -70°C pour les dosages ultérieurs. 900 mL de milieu frais ont été ajoutés et additionnés à 100 mL de MTT.

Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu a été retiré et les matériaux ont été transférés dans de nouveaux puits vides. 500 mL d'un mélange éthanol/Diméthyle sulfoxide (DMSO) volume à volume ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont alors été agitées pendant 5 mn puis 100 µL de chaque suspension ont été transférés dans des plaques de 96 puits. L'analyse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre d'absorption photonique à une longueur d'onde de 570 nm. Les témoins de culture ont été réalisés dans 3 puits; 5.10^4 cellules ont été ensemencées sur un support plastique. Le blanc a été réalisé sur 100 µL d'un mélange volume à volume d'éthanol/DMSO.

- Viabilité cellulaire

L'étude de la viabilité cellulaire est basée sur la capacité des cellules vivantes à exclure le colorant bleu trypan. A chaque temps de culture, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS, puis 0,2 mL de trypsine ont été ajoutés afin de les décoller des supports. Le contenu de chaque puits a été transféré dans des tubes Eppendorf de 2 mL puis rincé avec 1 mL de milieu de culture. Les tubes ont été centrifugés durant 7 minutes à 7000 rotations par minutes (rpm). Le culot à ensuite été remis en suspension dans 0,5 mL de milieu de culture contenant 50% de bleu trypan. La suspension cellulaire a été agitée au vortex. Le comptage cellulaire à été effectué en double à l'aide d'une cellule de Malassez.

Morphologie cellulaire au microscope électronique à balayage (MEB)

Des échantillons métalliques ont été ensemencés à une concentration de 5.10^4 cellules.

Après 3 jours de culture, les échantillons ont été rincés dans du milieu de culture et transportés au centre d'Etude des Microstructures de l'université Claude Bernard de Lyon 1 (UCBL1) pour y être fixés et déshydratés.

Les cellules ont été rincées 1 fois dans du tampon phosphate 0,2 M à 400 mOsmol puis fixées pendant une heure avec du glutaraldéhyde 2% dans du PBS 0,2M (osmolarité 400 mOsmol). Les cellules ont ensuite été rincées dans du PBS 0,2 M pendant 1 heure puis post-fixées avec l'acide osmique 1% pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être à nouveau rincées rapidement à l'eau distillée.

Les cellules sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool à 30, 50, 80, 95%, 100% (trois bains) pendant 10 minutes puis un mélange volume à volume d'alcool 100%/ d'hexamethyldisilazane (HMDS) volume à volume pendant 10 minutes et enfin 2 bains de 5 minutes de HMDS.

Les échantillons ont été séchés par simple contact des surfaces non cellulaires avec un papier filtre puis fixés sur un porte-objet adapté à la microscopie électronique.

Le contact entre le support et la surface de l'échantillon est réalisé avec une goutte de laque d'argent. Les échantillons ont été placés sous vide puis métallisés par dépôt d'une couche d'or de 20 nm d'épaisseur.

Les observations ont été effectuées au centre d'Etudes des Microstructures de l'UCBL1 sur un MEB avec une tension de 20 kilovolts. Les images ont été réalisées aux grossissements x100, x500, x1500.

2. RÉSULTATS

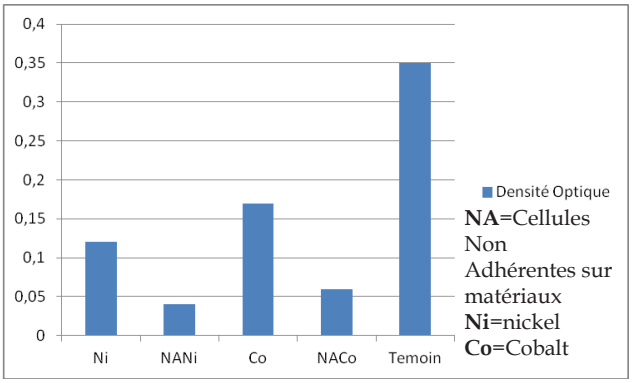

Figure 1 : Adhésion des cellules fibroblastiques sur les différents matériaux

Les fibroblastes adhèrent aux alliages à base de Nickel et de Cobalt.

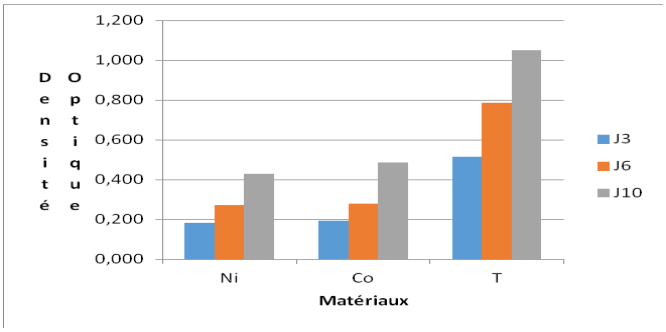

Figure 2 Prolifération des cellules fibroblastiques sur le matériau en fonction des différents temps de culture

Les cellules fibroblastiques prolifèrent en présence des alliages à base de Nickel et de Cobalt.

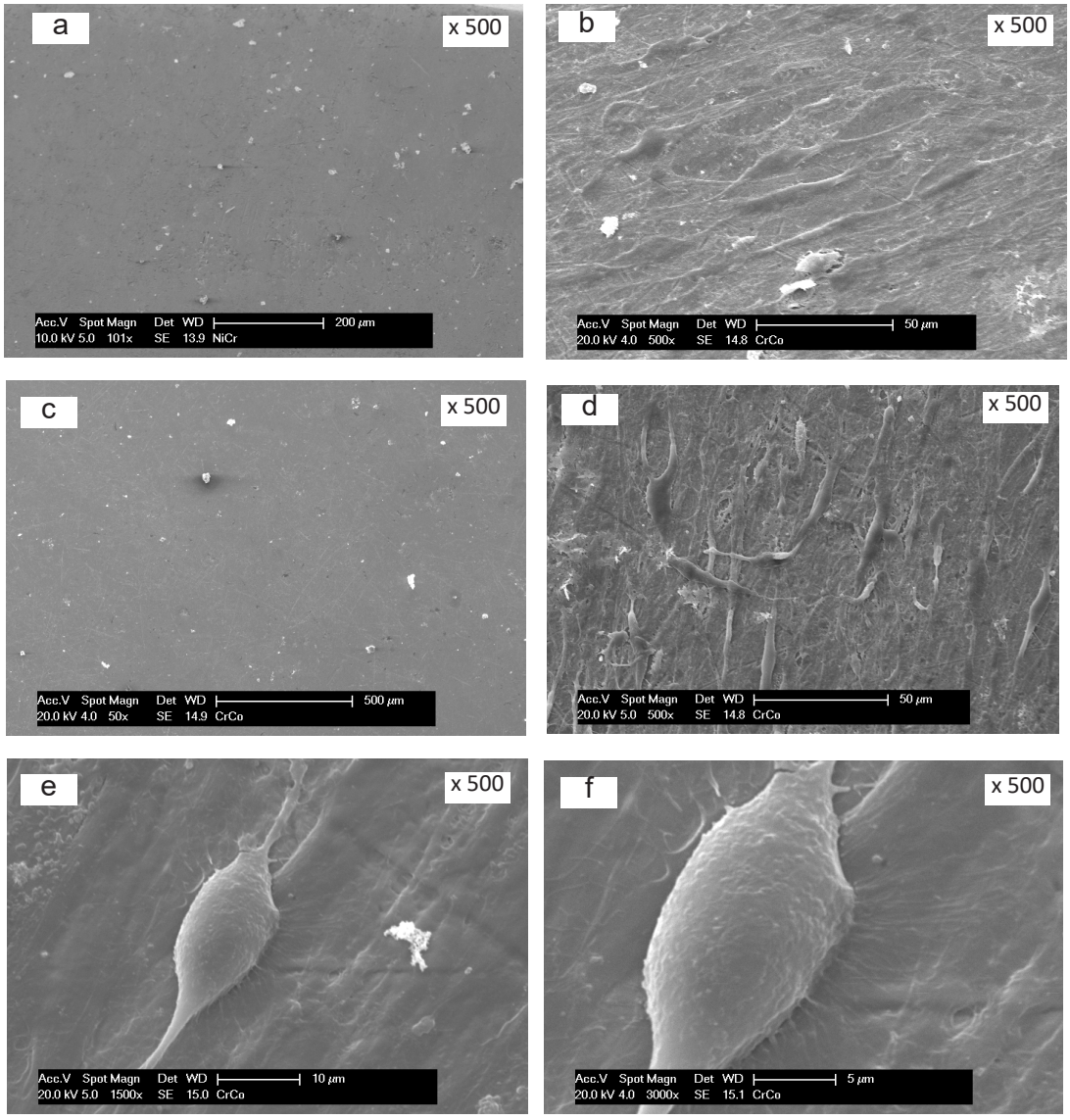

Figure 3 : Observation des fibroblastes par microscopie électronique à balayage après culture en présence de nickel-chrome et de cobalt-chrome

a) Ni-Cr sans cellules, b) CoCr sans cellules, c) NiCr avec cellules, d) CoCr avec cellules, e) f) fibroblastes aux grossissements x1500 et x3000.

Les cellules fibroblastiques adhèrent et prolifèrent à la surface des matériaux.

 © EDUCI 2019

3. DISCUSSION

3.1. TEST D'ADHÉSION

L'adhésion est réalisée en ensemençant la pièce métallique par le dépôt de 100 microlitres de suspension cellulaire à 500000 cellules/mL. L'adhésion des cellules à la pièce n'est pas systématique, des cellules sont entrainées au fond du puits. La stabilité de la goutte de suspension cellulaire sur le matériau a été difficile à obtenir et des cellules ont été entrainées au fond des puits (figure 1). Ce qui explique que qu'il y ait moins de cellules sur les matériaux par rapport au témoin. Néanmoins, les fibroblastes adhéraient aux matériaux. Cette observation corrobore celle de Mustafa [9]. Les cellules fibroblastiques ont adhéré à la surface des deux alliages matériaux. Cependant, l'adhésion cellulaire est plus marquée sur les alliages à base de cobalt que sur ceux à base de nickel.

3.2. TEST DE PROLIFÉRATION ET DE VIABILITÉ

Les résultats montrent que la croissance cellulaire augmente en fonction du temps de culture quel que soit le matériau. Une prolifération cellulaire plus élevée a été observée sur le cobalt comparativement au nickel. Cependant, la prolifération cellulaire observée sur les alliages, à différents temps, reste inférieure à celle sur les puits témoins. Le test MTT permet de mesurer la viabilité et la prolifération cellulaire. Ce test a montré une prolifération cellulaire au contact des alliages Nickel-Chrome et Chrome-Cobalt. Elle augmentait régulièrement du 3ème au 10ème jour de culture quel que soit le support. L'adhésion, et surtout la prolifération des fibroblastes sur les matériaux semblent montrer la cytocompatibilité des alliages nickel-chrome et chrome-cobalt. Ce résultat est en accord avec les observations d'Alp et *al.* [3], Trombetta et *al.*[10] et Wataha et *al.*[11] , pour qui, les alliages nickel-chrome et chrome cobalt n'ont pas d'effets nocifs sur la viabilité cellulaire. Cependant, cette prolifération reste inférieure au plastique témoin. Cette observation qui pourrait traduire une influence des matériaux sur les cellules comme le stipulent Bumgardner et *al.* [12] n'est, en effet, que le reflet de la perte de cellules sur le matériau lors de l'ensemencement de ceux-ci. Les mêmes quantités de cellules ayant été ensemencées à la surface des matériaux et sur le plastique témoin.

3.3. MORPHOLOGIE CELLULAIRE AU MEB

Il a été observé la présence d'un tapis cellulaire qui recouvre toute la surface des matériaux après 6 jours de culture. Les cellules ont une forme ovoïde avec de longs prolongements cytoplasmiques qui s'entremêlent. Les cellules ont proliféré et se sont étalées sur les matériaux. L'observation de la surface des matériaux montre certaines aspérités liées à la confection des pièces. Celles-ci sont dues, selon Zhang et *al.* [13], à des défauts de fonderie. Elles contribuent sûrement à l'adhésion cellulaire sur les matériaux. Cette éventualité est en accord avec les observations de Wirth [14] qui indique que l'adhésion cellulaire est influencée par l'état de surface des matériaux. Totefois, ces aspérités sont néfastes pour l'activité cellulaire selon Mc Ginley et *al.* [15] car elles induiraient une réduction de l'activité métabolique des cellules mais également une toxicité cellulaire [16].

Ces observations ont permis de mettre en évidence la morphologie des cellules fibroblastiques sur les différents matériaux. Cependant, elles ne permettent pas de quantifier le nombre de cellules vivantes à la surface de chaque matériau, ce qui justifie l'utilisation du test MTT.

CONCLUSION

L'évaluation de la biocompatibilité cellulaire de alliages nickel-chrome et chrome cobalt semble montrer qu'ils sont biocompatibles. En effet, les cellules fibroblastiques y prolifèrent et adhèrent comme le montrent les tests MTT (bromure de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium) et la microscopie électronique à balayage (MEB). Les alliages à base de Cobalt présentent une meilleure biocompatibilité comparée à ceux à base de Nickel. Cependant, ces alliages d'usage courant en prothèse fixée, présentent des risques (allergies, toxicité). Ainsi, les praticiens pourraient réaliser des limites juxta ou supra-gingivales afin de réduire le contact entre l'élément prothétique et la muqueuse gingivale, mais également, à proposer des matériaux cosmétiques tels que les céramiques, comme alternatives aux alliages non précieux. Ainsi, les restaurations céramo-céramiques sont idéales; à défaut les couronnes céramme-métallique seront à jonction céramique-dent.

RÉFÉRENCES

1- WATAHA J-C., MESSER R-L. Casting alloys. *Dent clin North Am* 2004; 48: 499-512.

2- ELIASZEWICZ-WAJNSZTOK S, TAVERNIER E. Analyse des taux de survie et complications des différentes solutions prothétiques : revue de littérature. *Rev Odont Stomat* 2009; 38:187-207.

3- ALP G, ÇAKMAK G, SERT M, BURGAZ Y. Corrosion potential in artificial saliva and possible genotoxic and cytotoxic damage in buccal epithelial cells of patients who underwent Ni-Cr based porcelain-fused-to-metal fixed dental prostheses. *Mutat Res* 2018; 4:19-26.

4- BUMGARDNER JD, LUCAS L. Corrosion and cell culture evaluations of nickel-chromium dental casting alloys. *J Appl Biomater* 1994; 5: 203–213.

5- WILLIAMS D. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008, 29(20): 2941-2953.

6- EXBRAYAT P, COUBLE ML., MAGLOIRE H, HARTMANN DJ. Evaluation of the biocompatibility of a Ni-Cr-Mo dental alloy with human gingival explant culture in vitro: Morphological study, immunodetection of fibronectin, and collagen production. *Biomaterials* 1987 ; 8 :385-392

7- EXBRAYAT P. Question CES : la biocompatibilité des matériaux dentaires. *Journal de Biomatériaux Dentaires* 1998 ; 13 : 177- 230.

8- MOSSMAN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals. Application to Proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63.

9- MUSTAFA K,ODEN A,WENNBERG A. The influence of surface topography of ceramic abutmaents on the attachment and proliferation of human oral fibroblasts. *Biomaterials* 2005; 26(4) :373-81.

10- TROMBETTA D, MONDELLO M, CIMINO F, CRISTANI M, PERGOLIZZI S, SAIJA A. Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium. *Toxicology Letters* 2005; 159(3), 219-225.

11- WATAHA JC. Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2000; 83(2): 223-234.

12- BUMGARDNER JD, LUCAS LC. Cellular response to metallic Ions released from Nickel-chromium dental alloys. *J.Dent Res* 1995; 74 (8): 1521-1527.

13- ZHANG CY, CHENG H, LIN DH, ZHENG M, OZCAN M, ZHAO W, YU H. Effects of recasting on the biocompatibility of a Ni-Cr alloy. *Chin J Dent Res* 2012; 15 (2):105-13.

14- WIRTH C, LAGNEAU C, EXBRAYAT P. Cell behavior of rat calvariat bone cells on NiTi with different surface roughness. *Europ Cells Mater* 2003; 5: 57-70.

15- MCGINLEY EL, MORAN GP, FLEMING GJ. Biocompatibility effects of indirect exposure of base-metal dental casting alloys to a human-derived three-dimensional oral mucosal model. *J Dent* 2013; 41(11):1091-100.

16- RISTIC L, VUCEVIC D, RADOVIC L, DJORDJEVIC S, NIKACEVIC M, COLIC M. Corrosive and cytotoxic properties of compact specimens and microparticles of Ni-Cr dental alloy. *J Prosthodont* 2014 ; 23(3):221-6.

 © EDUCI 2019