

50376
1999
133

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE CHIMIE

Année : 1999

N° : 2538

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I
Spécialité :
Spectroscopie et réactivité des systèmes chimiques.

Présentée et soutenue publiquement

Par

Jean Christophe HORNEZ
le 23 juin 1999

**EVALUATION PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE
D'ALLIAGES DENTAIRE A BASE DE PALLADIUM.**

Directeur de Thèse : H.F. HILDEBRAND.

JURY

MM.

R. DELOBEL
J. BREME
B. PELLAT
A. IOST
M. TRAISNEL
D. JOLY

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

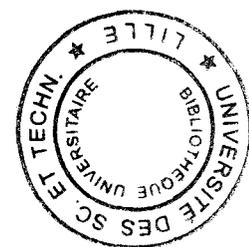
SCD LILLE 1



D 030 219384 7

AVANT PROPOS

Ce travail a été mené dans le cadre d'une convention CIFRE (N° 51/1995) entre l'ANRT, le Ministère de la Recherche et de la Technologie, l'Entreprise ENGELHARD-CLAL à Paris et le Groupe de Recherche sur les Biomatériaux (GRB) à la Faculté de Médecine de Lille.



Je dédie ce travail

A ma fille Tiffanie

A ma femme Marie-Odile

A mes parents

A tous les membres de ma famille

qui par leur soutien et leur aide ont permis d'aboutir à la réalisation et à la soutenance de cette thèse.

A tous mes Amis

Aux membres de mon Jury

Monsieur le Professeur René DELOBEL

Docteur d'État ès Sciences Physiques

Directeur du Laboratoire du Génie des Procédés d'Interactions Fluides, Réactifs, Matériaux (GPRIM)

École Nationale Supérieure de Chimie de Lille (ENSCL)

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Veillez trouver en ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Hartmut F. HILDEBRAND

Docteur d'État ès Sciences Naturelles

Directeur de Recherche INSERM

Responsable du Groupe de Recherche sur les Biomatériaux (G.R.B.)

Laboratoire de Biophysique de la Faculté de Médecine de Lille

Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir au sein de votre laboratoire où vous m'avez permis d'acquérir de nombreuses techniques dans le domaine des biomatériaux. Par vos compétences, vous avez su m'aider et vous rendre disponible à chaque fois que cela était nécessaire.

Dans un contexte de travail parfois difficile et très prenant, votre sens du contact et votre humour ont apporté une ambiance chaleureuse au laboratoire. Je vous remercie sincèrement pour l'encadrement et les compétences que vous m'avez apportées tout au long de ces trois années.

Monsieur le Professeur Jürgen BREME

Docteur Ingénieur

Directeur du Département Sciences des Matériaux – Métaux
Universität des Saarlandes à Saarbrücken, Allemagne.

Vous avez bien voulu accepter de juger ce travail. Par votre compétence tant dans le domaine de la métallurgie que dans celui de l'électrochimie et de la biologie, vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury, malgré vos lourdes charges quotidiennes.

Veillez trouver ici ma reconnaissance et mon profond respect.

Monsieur le Professeur Bernard PELLAT

Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université René Descartes (Paris V)

Docteur d'État ès Sciences Naturelles

Professeur des Sciences Biologiques, Praticien Hospitalier

Responsable du Laboratoire de Physiopathologie des Tissus non Minéralisés

Malgré vos nombreuses occupations et vos lourdes responsabilités, vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail.

Soyez en sincèrement remercié et veuillez trouver mon profond respect..

Monsieur le Professeur Alain IOST

Docteur d'État ès Sciences Physiques

Responsable de l'Équipe Matériaux

École Nationale Supérieure des Arts et Métiers (ENSAM), Lille

Vous avez accepté avec spontanéité de juger mon travail. Je suis très sensible à votre confiance. J'ai pu profiter de votre enseignement clair et vos discussions objectives.

Que cet ouvrage soit l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon estime.

Monsieur le Docteur Michel TRAISNEL

Docteur Ingénieur

Maître de Conférence

IUT de Chimie, Université Lille 2, Villeneuve d'Ascq

Vous m'avez encadré pour tous les travaux d'électrochimie. A tout moment vous étiez prêt à répondre à mes nombreuses questions.

J'ai pu bénéficier de vos compétences.

Pour votre aide apportée au quotidien et votre disponibilité, soyez sincèrement remercié.

Monsieur Dominique JOLY

Responsable Technique au Pôle Dentaire de l'Entreprise ENGELHARD-CLAL, Paris

Pour l'accueil chaleureux et pour l'investissement que vous avez engagé dans le suivi de ce travail ainsi que pour les nombreuses explications apportées dans le domaine prothétique.

Soyez en vivement remercié.

Nous tenons à remercier tous les membres de l'Entreprise ENGELHARD-CLAL et plus particulièrement :

Madame le Docteur Nadine SPATH

Vous étiez à l'origine de ce travail et vous m'avez suivi et dirigé au sein de l'Entreprise tout au long de ces trois années. Votre compétence était pour moi d'un grand profit.

Madame Annie LEMARCHAND

Département Recherche et Développement

Pour votre disponibilité constante et l'apport technique apporté pour la réalisation des échantillons. Je tiens particulièrement à vous remercier pour la réalisation et l'interprétation des microstructures.

Monsieur Joël COMMINSOLI

Pour l'intérêt que vous avez montré pour ce travail tout au long de son déroulement et pour les nombreuses discussions enrichissantes.

Monsieur Denis BROSSON

Pôle Dentaire

Pour votre disponibilité et toute votre aide apportée pour les traitements thermiques effectués sur les alliages et la réalisation des poudres.

Monsieur Pierre TEVENAI

Département Recherche et Développement

Pour m'avoir permis de bénéficier de votre grande compétence dans le domaine de la fonderie et avoir réalisé la coulée des alliages.

Votre enseignement m'était particulièrement précieux.

Au membres et à mes amis à de l'ENSCL :

Monsieur le Professeur Jean Marie LEROY

Pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et permis de réaliser une grande partie de ce travail. Veuillez accepter ma profonde reconnaissance.

Madame Christine PELEGRIS

Monsieur Fouad BENTIS

Pour les travaux réalisés en commun.

Monsieur Christel PIERLOT

Pour m'avoir permis de bénéficier de vos connaissances quant au traitement des données par l'intermédiaire d'un plan d'expériences.

Monsieur André TRAISNEL

Pour votre disponibilité et l'aide apportée quant à la programmation des cartes d'acquisitions.

Monsieur Christian BAGDAD

Pour les conseils de préparation concernant les mesures ICP.

Et à

Mademoiselle DUFRESNE

Pour l'aide apportée à l'ENSAM quant aux techniques de polissage et pour vos précieux conseils concernant la microscopie électronique.

A tous mes Amis et Collègues du GRB et du Laboratoire de Biophysique pour leur aide, leur gentillesse et les nombreuses discussions.

Permettez-moi d'exprimer une pensée particulière à

Annie LEFEVRE

Pour m'avoir initié aux techniques du laboratoire et pour m'avoir apporté une aide importante et précieuse au niveau des manipulations de clonage.

Francine MONCHEAU

Pour sa disponibilité au quotidien.

Philippe ROCHER

Pour l'entraide au niveau des essais électrochimiques.

Marc LINEZ

Pour les essais électrochimiques réalisés dans les milieux bactériens.

Pascal BRICHE

Pour l'aide technique apportée quant à la réalisation de pièces mécaniques et de montages électriques.

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION	7
2 GENERALITES	10
2.1 PARAMÈTRES BIOLOGIQUES	11
2.1.1 Généralités sur les Biomatériaux	11
2.1.1.1 Définition.....	11
2.1.1.2 Historique	12
2.1.2 La chirurgie buccale et maxillo-faciale.....	15
2.1.2.1 Les matériaux utilisés en art dentaire	16
2.1.2.2 Cahier des charges	17
2.1.3 Evaluation des risques (alliages Pd Ag Cu Au)	18
2.1.3.1 Effet cytopathogénique de différents métaux.....	18
2.1.3.2 Risques et biocompatibilité du palladium	19
2.1.3.2.1 Effets biologiques et toxiques du palladium.	19
2.1.3.2.2 Allergie au palladium	20
2.1.3.2.2.1 Définition de l'allergie de contact.....	20
2.1.3.2.2.2 Réactions en présence de restauration dentaire	21
2.1.3.2.2.3 Tests d'allergie au palladium	21
2.1.3.3 Risques et biocompatibilité de l'argent.....	23
2.1.3.3.1 Biocompatibilité <i>in vitro</i> (culture cellulaire).....	23
2.1.3.3.1.1 L'argent et les autres métaux	23
2.1.3.3.1.2 L'argent seul	24
2.1.3.3.1.3 L'argent dans les amalgames dentaires.....	25
2.1.3.3.2 Biocompatibilité <i>in vivo</i>	26
2.1.3.3.2.1 L'argent dans les ciments.....	26
2.1.3.3.2.2 Toxicité de l'argent <i>in vivo</i>	27
2.1.3.3.3 Mécanisme d'action de l'argent.....	28
2.1.3.3.3.1 Effets sur la peroxydation lipidique.....	28
2.1.3.3.3.2 Action de la métallothionéine sur l'argent.....	28
2.1.3.3.3.3 Action antivirale de l'argent.....	29
2.1.3.3.3.4 Action antiseptique et bactériostatique de l'argent	30
2.1.3.3.4 Action sur le métabolisme <i>in vivo</i>	31
2.1.3.4 Risques et biocompatibilité du cuivre	32
2.1.3.4.1 Biocompatibilité du cuivre métallique et ionique.....	33
2.1.3.4.1.1 Cytotoxicité du cuivre métallique.....	33
2.1.3.4.1.2 Cytotoxicité de l'ion Cu ²⁺	33
2.1.3.4.1.3 Génotoxicité du cuivre dans un complexe moléculaire.....	34
2.1.3.4.2 Mécanisme d'action du cuivre.....	34
2.1.3.4.2.1 Rôle du cuivre dans les cytochromes	34
2.1.3.4.2.2 Rôle du cuivre dans la chlorophylline	35
2.1.3.5 Action mutagène.....	35
2.1.3.6 Conclusion	37
2.2 PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES.....	38
2.2.1 Les éléments d'alliages.....	38
2.2.1.1 Le palladium	38
2.2.1.1.1 Propriétés	38
2.2.1.1.2 Propriétés chimiques.....	39

2.2.1.1.3 Le Palladium dans un alliage.....	40
2.2.1.2 L'argent	41
2.2.1.2.1 Propriétés physiques	42
2.2.1.2.2 Propriétés mécaniques	42
2.2.1.2.3 Propriétés chimiques.....	43
2.2.1.2.4 Applications de l'argent et de ses sels.....	43
2.2.1.2.5 L'argent dans un alliage.	44
2.2.1.3 Le cuivre	45
2.2.1.3.1 Propriétés du cuivre	45
2.2.1.3.2 Propriétés chimiques.....	45
2.2.1.3.3 Le cuivre dans un alliage.....	46
2.2.1.4 L'or	47
2.2.1.4.1 Propriétés physiques et mécaniques	47
2.2.1.4.2 Propriétés chimiques.....	48
2.2.1.4.3 L'or dans un alliage.....	48
2.2.1.5 Les métaux d'addition	49
2.2.1.5.1 L'étain.....	49
2.2.1.5.2 L'indium.	49
2.2.1.5.3 Les autres métaux d'addition.....	50
2.2.2 Diagrammes binaires et ternaires (<i>Pd-Cu-Ag-Au</i>)	51
2.2.3 Microstructure	59
2.2.4 La liaison céramique.	61
2.2.5 La corrosion	62
2.2.5.1 Définition générale de la corrosion et différents types de corrosion.....	62
2.2.5.1.1 La corrosion chimique	62
2.2.5.1.2 Corrosion électrochimique.	62
2.2.5.1.3 La corrosion bactérienne.	62
2.2.5.2 Principales formes de corrosion	63
2.2.5.2.1 Corrosion généralisée ou uniforme.....	64
2.2.5.2.2 Corrosion localisée.	64
2.2.5.2.2.1 Corrosion localisée macroscopique.....	64
2.2.5.2.2.2 Corrosion localisée microscopique.....	65
2.2.5.3 Le ternissement.....	67
2.2.6 <i>Electro galvanisme buccal et sa pathologie</i>	67
2.2.6.1 Pathologie dentaire locale.....	68
2.2.6.2 Pathologie locorégionale	68
2.2.6.3 Pathologie générale.....	68
2.3 CONCLUSION	68
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	69
3.1 MATÉRIAUX ÉTUDIÉS	70
3.1.1 <i>Type cellulaire utilisé</i>	70
3.1.1.1 Fibroblastes NIH 3T3	70
3.1.1.2 Cellules épithéliales L132	70
3.1.2 <i>Alliages commerciaux</i>	71
3.1.3 <i>Alliages expérimentaux Pd-Cu-Ag-Au</i>	72
3.1.3.1 Cahier des charges	72
3.1.3.2 Plan d'expériences.....	73
3.1.4 <i>Elaboration et caractérisation des alliages</i>	74
3.1.4.1 Préparation des alliages	76

3.1.4.2	Préparation des pastilles	76
3.1.4.3	Préparation des poudres.....	77
3.1.4.4	Caractérisation de surface (confocale)	79
3.2	MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	80
3.2.1	<i>Culture cellulaire</i>	80
3.2.1.1	Prolifération cellulaire	80
3.2.1.2	Viabilité cellulaire (Méthode du clonage).....	81
3.2.1.3	Test inflammatoire (Cellules Géantes Multinucléées)	81
3.2.1.4	Morphologie cellulaire (MEB)	82
3.2.2	<i>Méthodes électrochimiques</i>	83
3.2.2.1	Mesures effectuées avec le bioréacteur	84
3.2.2.2	Polarisation globale	85
3.2.2.3	Polarisation anodique	86
3.2.2.4	Potentiel d'abandon	86
3.2.2.5	Potentiel d'abandon 10 mesures	86
3.2.2.6	Indice de nobilité.	87
3.2.3	<i>Relargage</i>	87
4	ETUDE DE LA CYTOCOMPATIBILITÉ DES ALLIAGES COMMERCIAUX	88
4.1	RÉALISATION DES ESSAIS	89
4.1.1	<i>Prolifération cellulaire</i>	89
4.1.2	<i>Viabilité cellulaire</i>	92
4.1.3	<i>Morphologie cellulaire</i>	98
4.1.4	<i>Evaluation de l'effet inflammatoire</i>	103
4.2	CLASSEMENT ET CORRELATIONS	107
4.2.1	<i>Classement</i>	107
4.2.2	<i>Corrélations</i>	113
4.3	CONCLUSION	114
5	ETUDE DES ALLIAGES EXPERIMENTAUX (Pd-Cu-Ag-Au).....	115
5.1	CARACTÉRISATION PHYSIQUE.....	116
5.1.1	<i>Etude de la microstructure</i>	116
5.1.1.1	Echantillonnage et polissage préparatoire	116
5.1.1.2	Attaque.....	116
5.1.1.3	Etude des alliages expérimentaux.....	118
5.1.1.3.1	Les alliages Pd-Ag.....	118
5.1.1.3.2	Les alliages Pd-Cu.....	122
5.1.1.3.3	Les alliages Pd-Cu-Ag.....	124
5.1.2	<i>Dureté</i>	126
5.2	MESURES ÉLECTROCHIMIQUES	128
5.2.1	<i>Essais électrochimiques</i>	128
5.2.1.1	Polarisation globale	128
5.2.1.2	Polarisation globale dans la salive artificielle	129
5.2.1.3	Polarisation anodique	130
5.2.1.4	Potentiel d'abandon dans le NaCl 0,9%	130
5.2.1.5	Interprétation	132
5.2.1.5.1	Alliages Pd-Ag-Au	132
5.2.1.5.1.1	Palladium	132
5.2.1.5.1.2	Argent	132
5.2.1.5.1.3	Alliages Pd-Ag: E1 et E5.....	132

5.2.1.5.1.4 Influence de l'or.....	133
5.2.1.5.2 Alliages Pd-Au-Cu	133
5.2.1.5.2.1 Cuivre	133
5.2.1.5.2.2 Alliages Pd-Cu: E2 et E9.....	133
5.2.1.5.2.3 Alliages Pd-Cu-Au: E4 et E10.....	134
5.2.1.5.3 Alliages Pd-Ag-Cu-Au	135
5.2.1.5.3.1 Alliage Pd-Ag-Cu: E6	135
5.2.1.5.3.2 Alliages Pd-Ag-Cu-Au: E7, G et M	135
5.2.2 Conclusion.....	135
5.3 ETUDE DE LA CYTOCOMPATIBILITÉ.....	136
5.3.1 Prolifération cellulaire.....	136
5.3.2 Viabilité cellulaire.....	136
5.3.3 Morphologie cellulaire.....	143
5.3.4 Test inflammatoire.....	144
5.3.5 Conclusion.....	144
5.4 DISSOLUTION IONIQUE.....	147
5.4.1 Dissolution ionique obtenue dans l'eau déminéralisée.....	147
5.4.2 Dissolution ionique dans le milieu de culture.....	149
5.5 APPORT DU PLAN D'EXPÉRIENCES.....	151
5.5.1 Optimisation d'une composition.....	151
5.5.1.1 Addition d'étain et d'indium	156
5.5.1.2 Evaluation Physico-chimique	156
5.5.1.3 Evaluation des résultats biologiques.....	156
5.5.2 Conclusion.....	157
5.6 CORRÉLATION ENTRE LES RÉSULTATS	158
5.6.1 Corrélation composition – biologie.....	158
5.6.2 Corrélation composition – relargage.....	159
5.6.3 Classement des alliages.....	160
6 DISCUSSION.....	162
7 CONCLUSION	171
8 PERSPECTIVES	172
9 BIBLIOGRAPHIE	173

1 INTRODUCTION

Les cultures très anciennes comme les Egyptiens, Etrusques et Incas utilisaient l'or et les alliages à forte teneur en or pour leurs excellentes propriétés d'inaltérabilité et de biocompatibilité face aux conditions rencontrées au niveau buccal. Les alliages d'éléments nobles comme le palladium et le platine sont également reconnus comme possédant ces mêmes propriétés.

Depuis, des progrès énormes ont été enregistrés et nous comptons aujourd'hui environ 1100 alliages dentaires sur le marché européen pouvant contenir plus de 7 à 10 éléments différents. Mais c'est seulement depuis quelques dizaines d'années que l'on s'intéresse de plus en plus à l'impact biologique que peuvent avoir les différents éléments d'addition, notamment le cuivre, l'argent, l'indium, l'étain, le gallium.

De plus, la population de nos jours voit son espérance de vie s'accroître considérablement. Cela implique des problèmes de plus en plus fréquents rencontrés au niveau buccal et exigeant des reconstructions dentaires. Celles-ci doivent être à la fois parfaitement tolérées par l'organisme, posséder de bonnes propriétés mécaniques et être esthétiques, tout en étant peu coûteuses.

Jusqu'à présent, les alliages à base d'or remplissaient parfaitement les conditions de tolérance et de résistance, mais l'esthétique passe désormais plutôt par des reconstitutions en céramique de la couleur de l'émail. L'élaboration de la céramique sur un support métallique demande une cuisson de l'ordre de 900°C. Cette température s'approche des solidus de la plupart des alliages à base d'or, ce qui implique des déformations possibles de la reconstitution.

Pour pallier à ce problème, nous ajoutons aux alliages destinés à supporter un revêtement céramique des métaux permettant d'élever leur point de fusion. Le platine est un de ces métaux qui remplit parfaitement ces exigences requises. Cependant, il augmente en même temps le coût des alliages à base d'or, eux mêmes déjà fort coûteux.

De nombreuses recherches métallurgiques ont finalement introduit le palladium, élément d'ajout ou de base qui répond aux mêmes exigences que le platine, c'est à dire augmenter le point de fusion de ces nouveaux alliages céramo-métalliques à 1200°C, température bien supérieure à celle nécessaire pour la cuisson de céramique. De plus, le palladium baissait sensiblement le coût des alliages pouvant ainsi concurrencer les alliages non précieux. C'est depuis 1996 seulement que la situation économique a changé, suite à un retournement inévitable du marché des métaux rares ou précieux.

La concurrence aux alliages non précieux, d'une part, et le recul du marché des alliages à base d'or, d'autre part, ont fait des alliages à base de palladium l'objet d'une controverse s'attaquant notamment aux performances biologiques.

Afin de mieux répondre à cette controverse par des arguments objectifs et plus scientifiques, il nous est paru nécessaire d'évaluer la réponse biologique modulée éventuellement par des caractéristiques physico-chimiques spécifiques à chaque famille d'alliages. Ces alliages base-or ou base-palladium sont utilisés soit comme alliages conventionnels ou alliages céramo-métalliques.

Le but de ce travail est donc de déterminer la responsabilité du palladium quant à l'induction de différents effets toxiques ou de rechercher - si une toxicité existe - la contribution des autres éléments contenus dans les alliages dans l'induction des effets biologiques non souhaitables ou encore néfastes pour la santé du patient.

Une première approche sera effectuée par une évaluation biologique de 36 alliages dentaires déjà commercialisés à base d'or ou de palladium pour contribuer à l'obtention du marquage CE selon les normes ISO ou EN. Ce marquage CE, exigé par les Directives Européennes est une garantie de base pour les bonnes qualités physico-chimiques et biologiques de tout dispositif médical ou dentaire. Cette évaluation est donc effectuée par une série de quatre tests de cytocompatibilité en culture cellulaire, en espérant pouvoir classer les alliages les uns par rapport aux autres et pouvoir ainsi leur donner une valeur intrinsèque de cyto-ou biocompatibilité. De plus, cette première étape devrait permettre d'apprécier l'impact de la présence de palladium dans les alliages et également celui des différents éléments d'addition tels que l'argent et le cuivre.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons plus particulièrement aux alliages à base de palladium contenant du cuivre, de l'argent et de l'or dans des proportions définies par un plan d'expérience afin d'optimiser une composition permettant de conserver une bonne cytocompatibilité de l'alliage tout en diminuant le coût de celui-ci.

Le suivi de ces alliages débute dès leur préparation tout en respectant le Cahier des Charges établi avec l'Entreprise. Au fur et à mesure, nous étudierons leur structure métallographique, leur dureté, leur corrosion par une mesure de dissolution ionique et leur comportement électrochimique permettant d'évaluer leur susceptibilité à la corrosion dans le milieu buccal.

Ce groupe très homogène d'alliages à base de palladium fera ensuite l'objet d'une étude de cytocompatibilité identique à celle effectuée sur les alliages commerciaux afin d'appliquer le même classement selon un Index de Cytotoxicité.

Cet index devrait permettre d'évaluer l'impact des différents constituants de l'alliage et d'établir d'éventuelles corrélations entre la réponse biologique et leur composition, leurs caractéristiques mécaniques et leur comportement électrochimique, afin d'optimiser la formulation pour que l'alliage recherché réponde au mieux aux critères de cytocompatibilité tout en réduisant son coût.

Finalement, l'étude sera validée par l'évaluation physico-chimique et biologique de cet alliage optimisé.

Les résultats que nous avons obtenus et que nous exposons dans le présent mémoire, ont fait, en partie, l'objet des publications suivantes :

Ph. ROCHER, J.-C. HORNEZ, C. VÉRON, M. TRAISNEL & H.F. HILDEBRAND
Electrochemical evaluation of alloys used in implantology.
Implantodontie, 1996, **23**, 21-29

M. LINEZ, J.C. HORNEZ, Ph. ROCHER, C. NEUT, M. TRAISNEL, E. LENZ, K. LIEFEITH, C. ROMOND & H.F. HILDEBRAND
Influence de micro-organismes de la flore buccale sur la corrosion des biomatériaux dentaires: étude *in vitro*.
In: «Microorganismes Anaérobies», J.L. Tholozan, éd., Société Française de Microbiologie, Paris, (ISBN: 2-87805-021-5) 1997, pp83-88.

H.F. HILDEBRAND, J-C. HORNEZ & N. SPÄTH.
Biological and clinical effects of alloys used for dental restorations.
In: Proc. 3rd Europ. Precious Metals Conf., Eurométaux, Bruxelles, 1997, 19pp

H.F. HILDEBRAND & J-C. HORNEZ
Biological response and biocompatibility.
Chapter 9 in *Metals as Biomaterials*, J.A. Helsen et J. Breme, eds., John Wiley & Sons, Chichester (UK), (ISBN: 0-471-96935-4) 1998, pp265-290.

Ph. ROCHER, J-C. HORNEZ, M. TRAISNEL, J-M. LEROY, J. BREME & H.F. HILDEBRAND.
Corrosion of alloys in different test equipments: conventional corrosion cell vs bioreactor.
Innov. Tech. Biol. Med., 1998, sous presse

S. MOUWAKDIE, Ph. ROCHER, J-C. HORNEZ, M. TRAISNEL, J. BREME & H.F. HILDEBRAND
Evaluation électrochimique d'alliages à base de Cobalt contenant du Nickel à concentrations variables.
In : Actualités en Biomatériaux, Edts: M. Romillat & E. Mainard, Vol. V, 1998, in press

J-C. HORNEZ, Ph. ROCHER, N. SPÄTH, M. TRAISNEL & H.F. HILDEBRAND
Evaluation électrochimique d'alliages dentaires dans différentes salives artificielles.
In : Actualités en Biomatériaux, Edts: M. Romillat & E. Mainard, Vol. V, 1998, in press

Nous avons, en outre, collaboré à d'autres travaux qui ne s'inscrivent pas directement dans le cadre de ce mémoire, mais s'adressent à l'étude de la corrosion :

F. BENTISS, M. LAGRENEE, M. TRAISNEL & J-C. HORNEZ
The corrosion inhibition of mild steel in acidic media by a new triazole derivative.
Corrosion Science, 1999, **41**, 789-803

F. BENTISS, M. LAGRENEE, M. TRAISNEL & J-C. HORNEZ
Corrosion inhibition of mild steel in 1M Hcl by 2,5-Bis(2-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazol.
Corrosion (Journal of Science and Engineering), accepté pour publication.

2 GENERALITES

2.1 PARAMETRES BIOLOGIQUES

Les paramètres biologiques sont la base de cette étude et c'est à partir de ceux-ci que nous évaluerons la cytotoxicité des différents alliages dentaires étudiés.

2.1.1 Généralités sur les Biomatériaux

Bien que l'histoire rapporte une longue tradition d'utilisation de matériaux étrangers dans le corps humain, la science des biomatériaux n'est apparue en tant que telle qu'au début de ce siècle. Domaine pluridisciplinaire de l'ingénierie biomédicale, cette science bénéficie des progrès effectués tant en sciences et techniques des matériaux, qu'en biologie, médecine et chirurgie.

2.1.1.1 Définition

Comme pour toute science nouvelle mettant en jeu une technologie avancée, son développement rapide s'est accompagné de l'émergence d'une foison incontrôlée de termes inventés pour désigner les concepts nouveaux. Concernant le concept même de biomatériau, la première définition retenue fut proposée par Williams en 1982 :

"Un biomatériau est toute substance, autre qu'un médicament, ou une combinaison de substances, d'origine synthétique ou naturelle, qui peut être utilisée pour n'importe quelle durée, en tant que tout ou partie d'un système qui traite, augmente ou remplace un tissu, organe ou fonction du corps."

C'est seulement en mars 1986 qu'une Conférence de consensus a été organisée par la Société Européenne des Biomatériaux à Chester, Grande Bretagne, afin de statuer sur la validité de tous ces termes et d'éditer des définitions officielles, établies par 61 médecins et scientifiques concernés. En particulier la définition de Williams [109] fut simplifiée dans une formulation plus générale :

"Matériau non vivant utilisé dans un appareil médical, sensé interagir avec les systèmes biologiques."

Cependant connaissant la multitude de signaux transitant dans l'organisme, il est utopique de ne vouloir engendrer aucune réaction, il est donc préférable de tenter de la minimiser. La biocompatibilité peut également se définir comme étant :

La propriété d'un biomatériau qui est de déclencher chez l'hôte une réaction appropriée.

Les biomatériaux sont devenus des éléments indispensables à notre confort moderne, permettant à la fois d'améliorer les conditions de vie et d'accroître l'espérance de vie. La recherche a connu dans les toutes dernières décennies des progrès fulgurants, accompagnés d'une diversification des perspectives d'application.

Nous pouvons ainsi répertorier quelques applications courantes [6] :

- réparation et dispositifs d'assistance ou de suppléance fonctionnelle : prothèses orthopédiques, cardio-vasculaires, ophtalmologiques, odontologiques, auditives, plastiques, fonctionnelles motorisées, sang artificiel, organes artificiels,...
- agents de diagnostics ou thérapeutiques : agents de contraste pour l'imagerie médicale (RMN, radiologie), nouvelles formes pharmaceutiques telles que capsules de délivrance médicamenteuse progressive, fils chirurgicaux biodégradables,...

L'utilisation des biomatériaux pose cependant de nombreux problèmes : ils sont liés à la complexité de l'organisme vivant qui les accueille, et à la multiplicité des compétences mises en œuvre pour leur mise au point et leur implantation [8]. Au moins deux difficultés majeures se posent selon Langer et coll. [60] :

- au niveau théorique d'une part : les phénomènes physiques et chimiques qui régissent le fonctionnement du biomatériau et ceux de la réponse induite dans l'organisme sont incomplètement compris. Les domaines concernés sont ceux de la caractérisation des matériaux - polymères, métalliques ou céramiques - et de biologie cellulaire et moléculaire, associée à la modélisation informatique.
- d'autre part, en pratique, de nombreux matériaux s'avèrent moins performants qu'attendu, ou occasionnent des effets secondaires indésirables lors de leur utilisation. En effet, nombreux sont les matériaux utilisés comme biomatériaux qui n'ont pas été conçus pour cette application. Un gros effort est demandé aux biologistes, médecins et aux ingénieurs pour évaluer correctement le cahier des charges en termes de propriétés biologiques, chimiques et mécaniques, afin d'établir des normes de fabrication spécifiques des biomatériaux humains.

2.1.1.2 Historique

Baquet [6] a établi un classement des matériaux et concepts utilisés en cinq catégories qui marquent les étapes de leur évolution.

* Avant le XX^{ème} siècle, la préhistoire des biomatériaux a vu l'empirisme dominer sur la sélection des matériaux utilisés (ivoire, buis, plâtre..). Tous ces matériaux. "élaborés selon des procédés non spécifiques" [6], constituent la première catégorie et sont encore utilisés actuellement dans les pays sous-développés où la tradition demeure la règle.

* Descendants immédiats des précédents, les matériaux "élaborés selon des procédés spécifiques" [6] témoignent de l'éveil d'un souci propre à l'application du biomatériau : l'objectif est d'éliminer tous les constituants indésirables. Des normes régissent les techniques d'élaboration en termes de composition et de caractéristiques physico-chimiques et

mécaniques (par exemple les additifs utilisés lors de l'élaboration des polymères). Ces normes traduisent un même souci pour les effets néfastes immédiats et pour les risques potentiels, liés à la dégradation du matériau (occasionnée par la technique de stérilisation, lors de l'utilisation en milieu biologique...). Enfin ces normes ont un caractère évolutif, les progrès rapides de la recherche permettant de cerner de plus en plus précisément les origines de ces effets néfastes : pour les alliages métalliques, par exemple, les teneurs autorisées en éléments toxiques ont été progressivement abaissées.

Les matériaux recensés dans cette deuxième catégorie sont les alliages métalliques tels que l'acier inoxydable 316L, les alliages à base Co-Cr-Mo et Co-Cr-Mo-Ni, très largement utilisés, qui contiennent des quantités contrôlées en éléments mal tolérés tels que Ni, Cr, Co, et sont dits communément biotolérés [8,115]. Ces matériaux, aux coûts avantageux, sont appliqués aux implantations dentaires et orthopédiques à caractère temporaire.

Fruit des progrès effectués dans chacune des disciplines impliquées, un pas supplémentaire a été franchi ensuite avec l'apparition des soucis de "biocoopérativité" et de "bioactivité" [6].

Dans le premier cas, l'élaboration apporte au matériau une particularité qui "favorise le développement des tissus au sein desquels ils sont implantés", ou, au contraire, "évite le développement de phénomènes délétères à l'interface matériau/tissu" [6]. Ceci concerne d'une part le revêtement héparinique des matériaux destinés à être en contact avec le sang, et qui ne doivent en aucun cas activer la coagulation ni l'adhésion des plaquettes, risquant ainsi de créer une thrombose (l'héparine est libérée progressivement par le matériau tout au long de sa durée de service). D'autre part, les matériaux orthopédiques de comblement osseux présentent, ou développent d'eux-mêmes *in situ*, une fine couche superficielle dont la porosité favorise l'ostéogenèse par un effet purement mécanique dit d'ostéogenèse de contact (colonisation par les ostéoblastes facilitée d'où une reconstruction accélérée : cas de l'oxyde d'un alliage métallique passivable).

Tous ces matériaux biocoopératifs, dits aussi bioinertes [115], n'ont donc pas d'influence biochimique sur les tissus. Il s'agit de la plupart des céramiques, et des métaux passivables tels que le Ti, le Ta, le Nb et leurs alliages.

Plus évolués encore, les matériaux dits bioactifs sont conçus pour "non seulement favoriser, mais induire directement le développement des tissus au sein desquels ils sont implantés" [6]. Comme précédemment, le profil des surfaces est soigneusement étudié pour favoriser l'adhésion des cellules. En outre, ces surfaces sont recouvertes par un agent spécial tel que, pour les matériaux de reconstruction osseuse, les céramiques à base de phosphate de calcium (hydroxyapatite de composition identique à celle de l'os) ou les facteurs peptidiques de croissance. Défini par la conférence de mars 1986 comme un matériau "conçu pour induire une activité biologique spécifique" [109], le matériau bioactif conjugue des propriétés mécaniques et chimiques favorables à une réaction très rapide avec l'os, plus efficace que l'ostéogenèse de contact. Zhou [115] recense dans cette catégorie les bioverres, les oxydes comme SiO_2 , Na_2O , $\text{CaO}(\text{P}_2\text{O}_5)$ et l'hydroxyapatite (HA).

Cependant, tous ces matériaux n'offrent encore qu'une biocompatibilité ou une intégration tissulaire insuffisantes. Des effets néfastes apparaissent, de nature biochimique : inflammation (consécutive à l'acte chirurgical d'implantation), allergie, toxicité, cancérogénicité (produits de dégradation des polymères, alliages métalliques), ou de nature mécanique : décohésion entre la couche superficielle et le substrat [8].

Le milieu des années 80 voit donc apparaître le concept de matériau "bioartificiel" [6]. Il est constitué tout ou partie de macromolécules d'origine naturelle humaine ou animale. Le corail des squelettes madréporiques utilisé comme substitut osseux en est un exemple. La recherche tente ainsi de mettre au point des organes artificiels hybrides (ex. pancréas endocrine artificiel hybride) et des équivalents bioartificiels (substituts de derme, de peau, d'os, de vaisseau sanguin). En particulier, le matériau peut être l'objet de l'adjonction d'une composante cellulaire autologue (cellule prélevée sur le sujet lui-même) cultivée *in vitro*, et qui peut être éventuellement modifiée par manipulation génétique. Ce dernier progrès présente le double avantage de meilleures performances tant en termes de biocompatibilité que de longévité fonctionnelle. Cependant, de part leur origine naturelle, ils introduisent une préoccupation majeure liée au contrôle des matières premières (sélection des sujets donneurs), ou au moyen de détruire toute potentialité pathogène, sans affecter l'intégrité structurale et fonctionnelle du matériau. En outre, des problèmes éthiques se posent quant à l'utilisation de cellules humaines génétiquement modifiées.

En l'état actuel de la science des biomatériaux, la chirurgie dentaire utilise des matériaux qui sont pour la plupart biotolérés et bioinertes, la chirurgie orthopédique exploitant en outre les matériaux bioactifs. Dans la majorité des cas, le problème rencontré par les praticiens reste lié à la biocompatibilité insuffisante des prothèses (survenance d'allergies) ou à leur tenue mécanique. Actuellement par exemple, toutes les prothèses ostéo-articulaires sont implantées le plus tardivement possible, car elles doivent être remplacées périodiquement en raison de leur inévitable usure. Chaque nouvelle intervention consiste en une double opération : extraction de l'ancienne prothèse et implantation de la nouvelle. Il s'agit donc d'une intervention chirurgicale lourde et pénible. Dans le cas particulièrement incontournable des prothèses articulaires, il n'existe actuellement aucune solution permanente. Le développement du biomatériau totalement biocompatible et définitivement biofonctionnel reste une promesse de la recherche.

2.1.2 La chirurgie buccale et maxillo-faciale

La chirurgie buccale est une science très ancienne, les Etrusques sont admirés pour leurs imposants tombeaux, leurs routes, leurs ponts et leurs systèmes d'irrigations. Mais le domaine dans lequel ils étaient sans doute le plus en avance sur leur temps, c'est la dentisterie. Les fouilles menées dans les tombes ont révélé le degré d'ingéniosité et d'adresse atteint par leurs dentistes. A partir de dents, d'os et d'ivoire de bovins, qu'ils travaillaient et assemblaient à l'aide de minuscules chevilles, ils fabriquaient dentiers et des couronnes. Ils inventèrent le bridge (Figure 1), que confectionnaient avec de l'or mou de très adroits orfèvres. Ces appareils étaient ensuite fixés à la gencive en prenant appui sur d'autres dents afin d'éviter que leur port ne fût pas trop inconfortable. Curieusement, tous les crânes retrouvés jusqu'ici porteur de bridges ont appartenu à des femmes, comme celui que l'on voit ci contre muni de ces deux prothèses (Figure 2), (le bridge le plus long a glissé vers le bas). Les archéologues se demandent si les appareils dentaires en or ne constituaient pas un signe de richesse. La taille et la position proéminente de certains bridges laissent penser qu'ils étaient portés à des fins cosmétiques, tout en maintenant en place des dents branlantes.

Mais les acquis techniques de ces dentistes devaient se perdre dès lors que les Etrusques se trouvèrent absorbés par la jeune République romaine, et leur savoir devait sombrer dans l'oubli avec le reste de cette civilisation.

On n'a jamais découvert de bridge en or datant de la République ni de l'Empire. La qualité du travail des dentistes étrusques était telle qu'il faudra attendre, pour retrouver son égale, les années 1870, soit deux mille cinq cents ans plus tard, quand l'art dentaire est entré dans l'époque moderne [38].



Figure 1 : Bridge étrusque[38].



Figure 2 : Crâne de femme étrusque portant un bridge [38].

2.1.2.1 Les matériaux utilisés en art dentaire

La restauration dentaire concerne les opérations telles que l'obturation des caries, la pose d'appareillage de redressement dentaire, de couronnes, bridges, prothèse dentaire mobile (totale ou partielle)... Elle fait intervenir des biomatériaux essentiellement métalliques.

Avant de devenir une pratique médicale banale, l'art dentaire a obéi à des considérations d'ordre purement esthétique, réservées à des sujets rares et choyés (cf. pratique de l'embaumement mortuaire chez les Egyptiens...). Dans ces circonstances, l'or était spontanément très attrayant en raison de ses qualités de rareté de son aspect esthétique et cosmétique, de son inaltérabilité et de sa facilité de mise en œuvre. Cependant si sa noblesse lui confère intrinsèquement une très bonne tenue en bouche, sa ductilité extrême ne permet pas en revanche de l'utiliser à l'état pur : dès les premières pratiques de restauration dentaire (menées par les mêmes Egyptiens sur des sujets vivants!), il a été additionné de cuivre pour le durcir, de zinc et de cadmium pour abaisser son point de fusion lors des soudures, et de platine, iridium ou indium qui, tout en respectant sa noblesse thermodynamique lui confèrent de meilleures propriétés mécaniques [13].

Depuis, au fur et à mesure des progrès sont réalisés en restauration dentaire. Différentes compositions d'alliages ont été mises au point pour répondre aux besoins spécifiques de chaque application. Actuellement, plus de 1100 alliages sont recensés sur le marché européen [43] :

- *amalgame dentaire* : mercure allié d'argent, étain, cuivre, zinc.... : c'est le matériau le plus utilisé pour les obturations dentaires, quoiqu'assez controversé en raison de la toxicité reconnue du mercure.
- *alliages précieux* : alliages à base d'or, allié de platine, palladium, argent, cuivre et autres métaux du groupe platine.
- *alliages semi-précieux* : alliages à base de palladium et d'argent, avec des teneurs faibles de platine, cuivre et or. Ces deux classes de matériaux sont particulièrement utilisées pour les couronnes et bridges.
- *alliages non précieux* : servent pour toute opération d'orthopédie dentofaciale :
 - aciers inoxydables Fe-Cr(16-18)-Ni(10-14)-Mo (316L), utilisés de façon universelle pour les bagues et les fils.
 - alliages NiCr, par exemple le Ni-Cr-Mo pour couronnes et bridges.
 - alliages Co-Cr, dits Stellites, d'usage de plus en plus répandu, offrant une très grande résistance à la corrosion et une très grande dureté.
- *le titane et ses alliages* : Ces alliages connaissent actuellement un fort développement et plusieurs générations d'alliages ont déjà été conçues tenant compte de nombreux aspects biologique et physico-chimique. Ces alliages posent cependant quelques problèmes pratiques pour le praticien (leur forte oxydabilité à haute température les rend difficile à couler pour fabriquer la restauration). On les réserve de plus en plus pour l'implantologie.

En dehors des métaux, d'autres matériaux sont fréquemment utilisés pour les restaurations dentaires comme les ciments, résines et céramiques : colle polymère méthacrylate de méthyle additionné éventuellement de durcisseur [65] ou l'alumine (Al_2O_3) facilitant l'ostéointégration. Tous ces matériaux entrent en jeu dans la fabrication des prothèses mobiles ou fixes : pivots, dents en céramiques.

2.1.2.2 Cahier des charges

Le concept de biomatériau fait intervenir, nous l'avons vu, des spécialistes d'horizons très divers, qui, à chaque étape, sont souvent ignorants des contingences spécifiques imposées à l'autre extrémité de la chaîne. Les méthodes industrielles de conception technologique et de transformation sont inconnues des médecins, tout comme les procédures appliquées lors de l'utilisation médicale (stérilisation) et les conditions de service de l'implant en milieu vivant sont étrangères aux industriels. Il est donc nécessaire d'établir scrupuleusement un cahier des charges pluridisciplinaire rédigé de façon exhaustive.

Le biomatériau doit présenter des propriétés très spécifiques qui varient pour les diverses applications : en effet, les caractéristiques de biocompatibilité et le détail des propriétés mécaniques exigées dépendent étroitement de chaque type d'application. Le cas du biomatériau dentaire constitue un cas simple par rapport à une prothèse orthopédique par exemple.

L'alliage métallique dentaire doit présenter les propriétés suivantes [115] :

- *résistance à la corrosion*, en milieu physiologique (salive) à la température du corps humain. En particulier il doit présenter une corrosion minimale à 400mV/ECS, potentiel redox des fluides physiologiques, à un pH voisin de 7 (en réalité l'acidité est très variable, car liée à l'activité nutritionnelle).
- *biocompatibilité* : ce critère s'applique à plusieurs niveaux :
 - composition chimique de l'alliage (éviter les éléments toxiques pouvant occasionner des réactions toxiques, allergiques, inflammatoires).
 - propriétés diélectriques (forte résistivité électrique empêchant toute polarisation de surface néfaste à l'adhésion des cellules).
 - faculté de passivation (limitation des phénomènes de corrosion qui produisent un relargage ionique et l'émission d'un courant pouvant altérer tissus et fonctions).
- *biofonctionnalité* : les propriétés mécaniques doivent être les plus proches possible de celles du matériau remplacé, os ou dent (module élastique, résistance à l'usure, à la rupture, tenue en fatigue).
- *practicabilité* : ce critère incontournable inclut plusieurs aspects comme le facteur économique, la disponibilité du matériau et la facilité de mise en œuvre, de stérilisation, de conditionnement, de stockage, et toutes qualités indispensables à une utilisation conforme à l'exercice médical.

Comme pour tout biomatériau, le cahier des charges de l'alliage dentaire se résume en trois contingences : biocompatibilité, biofonctionnalité et résistance à la corrosion. C'est le détail de chacune d'entre elles qui est spécifique à l'application visée.

2.1.3 Evaluation des risques (alliages Pd Ag Cu Au)

Pour des raisons économiques, les alliages dentaires à base de palladium et d'argent sont de plus en plus employés et, de ce fait, l'impact de ces mêmes métaux sur l'organisme est de plus en plus étudié sur le plan de la toxicité et de la biocompatibilité.

En ce qui concerne le palladium, Hildebrand et coll. [45,49] ont fait le point et une mise à jour sur son comportement biologique. Une recherche de nouveaux éléments concernant notamment l'allergie au palladium actuellement en cours, pourra servir de complément à cet article déjà très exhaustif.

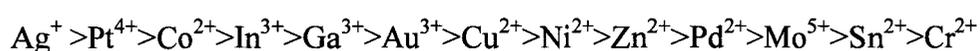
Pour ce qui est de l'argent, sa toxicité est depuis longtemps connue. Il était utilisé autrefois pour la purification de l'eau de boisson en raison de sa toxicité pour les micro-organismes. Les dérivés de l'argent sont généralement utilisés comme agents anti-infectieux [39]. L'absorption est digestive, cutanée, oculaire ou pulmonaire. Le transport se fait par l'intermédiaire du sang et aussi du liquide céphalo-rachidien. Le stockage de l'argent a lieu principalement au niveau du système endothélial: rate, foie, moelle osseuse, poumons, muscles, vaisseaux sanguins et peau (de façon décroissante). L'excrétion est presque exclusivement fécale par l'intermédiaire de la bile. Les cheveux sont aussi une voie d'élimination [39]. L'application dentaire de l'argent se retrouve dans différentes utilisations dont la plus importante est celle des amalgames dentaires "argent-mercure". Nous le retrouvons également dans les ciments de scellement et les alliages dentaires.

2.1.3.1 Effet cytopathogénique de différents métaux

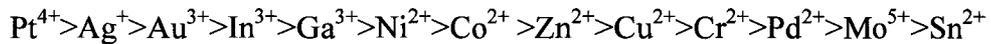
De récents éléments suggèrent que sous certaines conditions, divers cations métalliques sont libérés par des alliages dentaires [15]. Or, ces ions peuvent produire des effets contraires dans différents types de cellules *in vivo*.

Dans l'étude de Schedle et coll. [83], les effets cytopathogéniques de 13 différents cations métalliques ont été analysés sur des fibroblastes murins L-929, des fibroblastes gingivaux humains et des mastocytes humains. Les auteurs ont constaté une inhibition de l'absorption de la ³H-Thymidine dans les fibroblastes en culture, celle-ci étant proportionnelle aux doses de cations métalliques ajoutées (inhibitions doses-dépendantes avec des doses s'échelonnant de 0,0033 à 1,0 mmol/l).

L'ordre d'activité pour les fibroblastes L-929 (LOEL : *lowest observed effect level* ou « degré d'effet le plus faible observé ») est :



Un ordre d'activité similaire a été obtenu pour les fibroblastes gingivaux humains en culture primaire:



Dans les mastocytes humains, Ag^+ et Au^{3+} entraînent la production d'histamine toxique dose-dépendante tandis que d'autres cations métalliques sont sans effet sur la gamme de doses testées.

Pour rechercher les mécanismes des effets induits par les cations métalliques, les auteurs ont analysé l'ADN des fibroblastes L-929 et ont effectué une analyse ultrastructurale sur les cultures de ces fibroblastes. Les observations indiquent que l'ADN et l'ultrastructure des cellules L-929 et des fibroblastes gingivaux exposés à des cations métalliques cytopathogéniques révélaient des signes de nécrose mais aucun signe d'apoptose (mort programmée de la cellule).

A l'évidence, ces recherches montrent que divers cations métalliques produisent des effets cytopathogéniques doses-dépendantes sur différents types de cellules incluant les fibroblastes gingivaux humains et les mastocytes tissulaires [83].

D'après cette étude, l'ion palladium (Pd^{2+}) semble avoir, quant à lui, une faible activité aussi bien sur les cellules L-929 que sur les fibroblastes gingivaux.

Qu'en est-il donc de sa toxicité réelle?

2.1.3.2 Risques et biocompatibilité du palladium

L'exposition au palladium (Pd) est multiple. Nous notons d'abord l'exposition professionnelle au Pd et ses dérivés ou complexes lors du procédé de raffinage, en particulier dans les raffineries du platine (Pt). Le palladium est de plus en plus utilisé comme composante dans la joaillerie fine, couramment présent dans des alliages dentaires, et également utilisé dans les systèmes de télécommunication. Dans le paragraphe suivant, nous résumerons l'étude bibliographique effectuée dans le laboratoire du Groupe de Recherche sur les Biomatériaux (G.R.B.) [45,49].

2.1.3.2.1 Effets biologiques et toxiques du palladium.

Suspectant un effet toxique du palladium après son absorption et anticipant son entrée dans l'environnement humain par l'utilisation de pots catalytiques sur les automobiles, plusieurs auteurs ont étudié sur des animaux par différentes voies d'administration, la rétention, la distribution tissulaire, l'excrétion et le transfert placentaire du Pd.

La plupart de ces investigations ont été menées avec le Pd et les métaux du groupe Pt sous forme de sels simples ou complexes: chlorures ou dérivés ammoniacaux hydrosolubles du Pt, Ir, Os, Pd, Rh et Ru.

La rétention la plus importante du Pd est observée après injection intraveineuse, la plus faible après administration orale. Après une dose orale unique, la quasi totalité du Pd est

éliminée dans les selles. Par contre, après injection intraveineuse, des quantités identiques sont éliminées dans les urines et les selles. Quant à la distribution tissulaire, les plus fortes concentrations sont mesurées dans les reins, la rate et le foie. Une faible partie du Pd administré par voie intraveineuse chez des femelles de rat en gestation est retrouvée dans les fœtus.

Le Pd et ses dérivés peuvent induire des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques, en agissant via les groupements -SH sur des biosystèmes complexes : protéines, enzymes.... L'administration orale du PdCl₂ agit sur le système mono-oxygénase hépatique et diminue sensiblement le taux du cytochrome-P450 hépatique. Les sels Pd⁺⁺ ont également des effets métaboliques sur de nombreux autres enzymes en inhibant les activités de la prolyle hydroxylase, de la créatine kinase, de l'aldolase, de la déshydrogénase succinique, de l'anhydrase carbonique et de la phosphatase alcaline. Ces études suggèrent donc une interférence du Pd avec le métabolisme énergétique et les équilibres base/acides et d'électrolytes. De plus, le Pd augmente significativement le taux du sélénium hépatique et agit fortement sur la compétition Se-Hg. La limite d'exposition par inhalation du palladium est proposée à une concentration de 0,03 µg/m³.

Il est très important de faire la différence entre les sels solubles du Pd et le Pd métallique. Bien que des sels simples et complexes puissent avoir des effets hépato- et néphrotoxiques, aucune incidence biologique n'a été démontrée pour la forme métallique. Ceci est particulièrement important en raison de son utilisation croissante dans des alliages dentaires.

Les expériences du Groupe de Recherche sur les Biomatériaux (G.R.B.) avec des poudres de Pd métallique ou d'alliages dentaires contenant du Pd sur des systèmes de culture cellulaire n'ont révélé aucune influence sur la viabilité cellulaire et sur l'induction d'effets inflammatoires. La cytocompatibilité du Pd⁰ est comparable à celle de Au⁰, Pt⁰ ou Ti⁰.

Depuis quelques années toutefois, le palladium a suscité de nombreuses controverses quant à son effet sensibilisant. L'état actuel de nos connaissances sur ce problème d'allergie indique que la sensibilisation au Pd est probablement associée à celle du nickel (Ni).

2.1.3.2.2 Allergie au palladium

2.1.3.2.2.1 Définition de l'allergie de contact

L'allergie au palladium fait partie, comme celle au nickel et à d'autres métaux, de l'allergie de type IV de la classification de Coombs et Gell [23], c'est à dire une réaction retardée de type cellulaire sans formation d'anticorps. La réaction immunologique a lieu à la surface de lymphocytes T sensibilisés au Ni, Co, Cr ou autres substances et produisant des lymphokines lors d'un nouveau contact. Ces dernières induiront une réaction inflammatoire cutanée (eczéma, érythème) par leur effet cytotoxique sur les cellules épithéliales : allergie ou dermatose de contact.

Ce processus immunologique sans réaction cutanée est généralement appelé **sensibilisation**. Dès l'apparition d'une manifestation clinique, nous parlons **d'allergie**.

2.1.3.2.2.2 Réactions en présence de restauration dentaire

Les observations de cas d'allergies ou de sensibilisations au Pd en relation avec des restaurations dentaires sont extrêmement rares. La mise à jour en 1995 de l'étude bibliographique faite au laboratoire (G.R.B.) en 1993 n'a pas relevé d'autres cas.

Nous pouvons donc estimer de 10 à 12 le nombre des cas décrits démontrant une sensibilisation au Pd en relation avec des restaurations dentaires. 8 sur 10 cas montrent également une sensibilisation au Ni.

2.1.3.2.2.3 Tests d'allergie au palladium

Depuis le premier janvier 1994, le Docteur Y. DEJOBERT du service d'allergologie du CHRU de Lille a ajouté systématiquement sur la demande de Monsieur H.F. Hildebrand (Directeur du G.R.B.), le test au Pd dans la batterie standard des tests d'allergie de contact. De tous les patients examinés entre le 1.1.1994 et le 30.6.1995 pour déceler une allergie aux métaux, 171 ont montré une sensibilisation au Ni, dont 63 une sensibilisation simultanée au Pd.

Deux autres cas semblaient révéler une faible réaction uniquement au Pd. Pour confirmation de cette réaction les patients ont été testés une seconde fois; le résultat était identique: réaction uniquement au Pd (mais faible).

Un patient montrait une réaction combinée Pd-Cr, un autre Pd-Co, ce qui mène la totalité des patients sensibles au Pd à 67, que nous résumons et analysons dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Patients sensibilisés au Pd.

Sensibilisation	Nombre de patients	%	Observations
Pd	2	3	incertain
Pd+Ni	42	63	
Pd+Cr	1	1,5	
Pd+Co	1	1,5	
Pd+Ni+Cr	2	3	
Pd+Ni+Co	12	18	
Pd+Ni+Cr+Co	7	10	
Total	67	100	dont 63 patients Ni positif.

Le service d'allergologie et le GRB pratiquent actuellement un recensement global des patients sensibilisés aux métaux en tenant compte des autres allergènes Cr, Co et Hg, même sans être combinés à une sensibilisation au Ni ou Pd. En même temps, tous les patients sont soumis à un examen odontologique afin d'établir ou d'exclure une relation entre une

sensibilisation et une restauration dentaire métallique. De plus, les patients sont également testés avec leur prothèse dentaire si ce test est possible.

D'après l'étude effectuée par Pistor et coll. [74], il semblerait que les hypersensibilités au palladium seraient plutôt dues à des réactions croisées avec le nickel concernant des lymphocytes T clonés et non pas à une sensibilisation directe au palladium seul, c'est à dire, l'appareil immunitaire ne reconnaîtrait pas le palladium comme antigène, mais le confondrait avec le nickel. Cet aspect doit être considéré avec beaucoup de précautions, puisque nous serions en présence d'un des rares cas où la nature se trompe.

2.1.3.3 Risques et biocompatibilité de l'argent

Il n'existe que peu d'alliages dentaires précieux ou semi-précieux qui ne contiennent pas d'argent. Il est donc indispensable de faire une brève mise au point de l'état actuel de nos connaissances sur les effets biologiques de ce métal.

2.1.3.3.1 Biocompatibilité *in vitro* (culture cellulaire)

La culture cellulaire est la première étape permettant de déterminer la cytocompatibilité d'un élément de façon rapide et fiable.

2.1.3.3.1.1 *L'argent et les autres métaux*

En 1993, Wataha et coll [106]. publient une étude très intéressante concernant les effets de la densité cellulaire (nombre de cellules par unité de surface d'une culture monocouche) sur la cytotoxicité *in vitro* des ions métalliques provenant des matériaux dentaires. Les effets de la densité cellulaire peuvent expliquer les décalages des tests *in vitro*, tout particulièrement lorsqu'il s'agit d'une cicatrisation où la densité cellulaire varie avec le temps.

La densité cellulaire peut aider à clarifier le mécanisme de cytotoxicité des ions métalliques. Pour cela, les fibroblastes Balb/c 3T3 ayant des concentrations allant de 10.000 à 80.000 cellules par cm² sont exposés à 8 concentrations de 10 métaux différents (dont l'argent).

Après 24 heures d'exposition, l'activité de la déshydrogénase succinique et la synthèse de DNA sont mesurées pour étudier l'effet toxique. Les auteurs constatent que la densité cellulaire réduit notablement la sensibilité des fibroblastes à tous les ions métalliques exceptés Al³⁺ et Zn²⁺, mais l'amplitude de la réduction dépend du métal. De plus, la synthèse du DNA est plus inhibée que l'activité de la déshydrogénase succinique pour tous les ions métalliques sauf pour Zn²⁺. L'unique impact de la densité cellulaire sur chaque ion métallique se base sur l'hypothèse que l'effet n'est pas simplement causé par la dilution du nombre d'ions métalliques par cellule. Il en résulte que la concentration cellulaire doit être attentivement sélectionnée dans les tests *in vitro* de cytotoxicité. Le contact des unités cellulaires (forte densité) peut sensiblement augmenter la défense cellulaire et par conséquent diminuer les effets cytotoxiques.

Toutefois, connaître les sites de fixation des métaux lourds dans l'organisme peut apporter des éléments de compréhension concernant la toxicité du métal. Grâce à l'application de l'autométallographie aux examens histologiques de biopsies humaines et animales, il a été possible de localiser des traces d'or, d'argent et de mercure dans les tissus et les cellules qui n'étaient pas suspectés de contenir ces métaux. Notamment le zinc a pu être retrouvé dans les vésicules synaptiques au niveau des neurones du cerveau sous forme de groupements chélatés [25].

2.1.3.3.1.2 L'argent seul

Les effets toxiques de l'argent ont pu être mis en évidence sur des hépatocytes isolés de rats [5]. En effet, l'addition de AgNO_3 sur des hépatocytes fraîchement isolés cause une baisse dose-dépendante de la viabilité cellulaire. De plus, la toxicité de l'argent est accompagnée d'une diminution de concentration en thiols (groupement -SH) hépatiques et d'une augmentation de la peroxydation lipidique. Une réduction de glutathions (G-SH) provoque une augmentation de la vulnérabilité à la toxicité de l'argent, alors qu'il y a un effet de protection par un agent permettant de réduire les thiols. La toxicité est donc due à une complexation des groupements -SH ayant comme conséquence la formation de radicaux libres.

Les auteurs concluent que la perturbation des thiols intracellulaires joue un rôle très important dans le mécanisme induit par l'argent dans la mortalité des cellules hépatiques. Il apparaît donc ici une relation très étroite entre la présence de groupement -SH et les ions Ag^+ quant à la toxicité de l'argent sur les hépatocytes isolés de rats.

Concernant les alliages à base d'argent, leur toxicité peut être étudiée après érosion mécanique par addition sur des cellules en culture d'un extrait de la solution ou du filtrat de ce même extrait [112]. L'auteur constate une cytotoxicité importante de l'extrait, alors que le filtrat apparaît comme peu toxique pendant les premières 24 heures.

Takeda et coll. [95] observent le même phénomène sur les alliages Pd-Ag : les filtrats provenant des extraits de 1 à 3 jours ne sont pas toxiques, alors que les filtrats provenant d'extraits de 5 à 7 jours sont cytotoxiques et tout spécialement dans les alliages à haute teneur en palladium. Cependant, il constate que pour l'argent pur, l'extraction faite après un jour apparaît comme très cytotoxique alors que l'addition de palladium dans une quantité supérieure à 40% diminue notablement la cytotoxicité de l'alliage.

Il apparaît donc que la formulation de l'alliage est très importante quant à la cytotoxicité qu'il peut induire, indépendamment de celle de ses éléments constitutifs.

L'effet toxique de l'argent métallique est reconnu comme étant moins toxique que son sel [39] et a été mis en évidence *in vitro* dans le laboratoire du G.R.B. sur des cultures de cellules épithéliales humaines [46].

L'argent métallique est utilisé pour diminuer les effets toxiques, inflammatoires et infectieux de cathéters urinaires [62]. Un effet bactériostatique de l'argent métallique semble être exploité par l'auteur. D'autre part, il faut supposer que le traitement d'une surface de cathéter en latex ou d'autres polymères, induit la formation de complexes organo-métalliques séquestrant les effets toxiques et inflammatoires, et diminuant de ce fait ces mêmes effets, tant de l'argent pur que des métabolites organiques provenant des polymères.

Toutefois, la cytotoxicité des sels d'argent comme AgNO_3 et Ag_2SO_4 est largement supérieure à celle de l'argent métallique [62]. Comme la plupart des tests de toxicité s'effectuent par addition d'un sel soluble (généralement AgNO_3), Hall et coll. [40] utilisent une méthode électrochimique pour produire les ions Ag^+ et ils constatent que la solution d' Ag^+ anodique a la même toxicité qu'une solution de AgNO_3 .

2.1.3.3.1.3 L'argent dans les amalgames dentaires

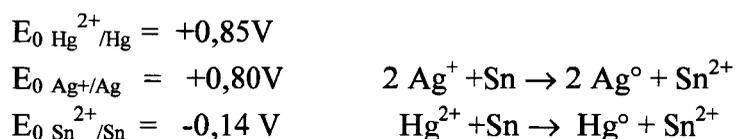
Les amalgames sont des alliages de mercure soit ternaires (Hg-Ag-Sn) pour les amalgames conventionnels, soit quaternaires (Hg-Ag-Sn-Cu) pour les amalgames modernes. La présence d'autres métaux en très faible quantité, comme le zinc, l'iridium ou le palladium est possible [102]. Les amalgames dentaires induisent fréquemment un tatouage des gencives [104]. Ce tatouage est constitué d'un dépôt métallique présent sous forme de granules fins ou sous forme de granules et fragments.

La présence de cellules géantes multinucléées, et des réactions macrophagiques ou inflammatoires montrent donc nettement que ce matériau n'est pas biologiquement inerte.

L'analyse élémentaire à la microsonde des fragments et des structures granulaires a révélé l'argent et le soufre comme constituants majeurs de ces granules. Les auteurs concluent qu'il y a très probablement formation d'un sulfure d'argent. Le métal puiserait du soufre aux dépens de l'organisme [47]. Il est d'ailleurs encore plus probable que ce composé ou complexe organo-métallique puisse être formé d'hydrate d'amine, de sulfate d'amine d'argent $[\text{Ag}(\text{NH}_3) - \text{NSO}_3 - (\text{Ag}(\text{NH}_3)_2 - 2\text{H}_2\text{O})]$, de sulfate d'argent et de carbonate d'argent [103].

Hanson et Pleva [41], rappellent que les risques de toxicité provoqués par l'amalgame deviennent considérables par la présence de prothèses en or dans la bouche qui créent un courant galvanique entre l'amalgame et l'or. L'amalgame se dégrade alors rapidement et libère des quantités importantes d'ions métalliques. Ceci nous conduit donc à nous intéresser plus particulièrement à la toxicité des amalgames. Grâce à un test sensible en culture cellulaire, une étude comparative de la toxicité relative des amalgames et de ses différents éléments constitutifs peut être mise en œuvre [56].

Le cuivre pur et le zinc ont une très forte cytotoxicité, significativement plus importante que l'argent et le mercure; l'étain pur est peu toxique [56]. La phase γ_1 de Ag_2Hg_3 révèle une cytotoxicité modérée, qui est significativement diminuée par une addition de 1.5 et 5% d'étain [56]. Les auteurs traduisent ce phénomène par la formation d'un film d'oxyde d'étain limitant ainsi la diffusion des ions. Cette diminution de toxicité pourrait être aussi s'expliquer par une simple réaction d'oxydoréduction entre l'étain et les ions Ag^+ et Hg^{2+} , si les ions Sn^{2+} sont peu toxiques.



Les ions Ag^+ et Hg^{2+} ne sont pas libérés, ils ne provoquent donc pas de réaction toxique, alors que les ions Sn^{2+} moins toxiques sont libérés dans l'organisme. L'auteur continue son étude en indiquant que 1.5% de Zn dans γ_1 contenant 1.5% de Sn accroît dramatiquement la cytotoxicité de γ_1 pour atteindre le même niveau que celle du zinc pur. Il conclut qu'à chaque fois que le zinc est présent dans les amalgames, une haute cytotoxicité est apparue. Cette seconde conséquence peut, elle aussi, être traduite en terme d'oxydoréduction:

$$E_0_{Zn^{2+}/Zn} = -0.76 \text{ V}$$

C'est donc l'élément le plus réducteur de l'amalgame, qui sera le premier oxydé et sera libéré sous forme ionique dans l'organisme en réduisant les autres métaux. Ceci explique la toxicité comparable à celle du zinc pur.

L'étude se poursuit en indiquant que les amalgames à haute teneur en cuivre ont la même cytotoxicité que les amalgames à faible teneur en cuivre (sans zinc). De la même façon, Cu ($E_0 = +0,34\text{V}$) est le plus réducteur par rapport à Ag et Hg. C'est donc le cuivre qui sera libéré préférentiellement, en réduisant Ag^+ et Hg^{2+} . Cu et Zn, lorsqu'ils sont présents, prennent donc la majeure contribution à la cytotoxicité de tous les alliages pour les amalgames.

2.1.3.3.2 Biocompatibilité *in vivo*

Toutes les investigations sur des biopsies chez l'homme de tatouages gingivaux dus aux amalgames dentaires, peuvent être considérés comme des études *in vivo* de l'effet biologique de l'argent.

Dans les paragraphes suivants, nous citerons essentiellement des travaux expérimentaux sur l'animal confirmant les observations faites chez l'homme.

2.1.3.3.2.1 L'argent dans les ciments

Les ciments dentaires sont des matériaux bicomposés (poudre ou liquide) qui sont mélangés juste avant leur emploi pour produire une substance "dure" utilisée à divers desseins :

- attacher temporairement ou de façon permanente des prothèses fixées sur les dents.
- remplir temporairement une dent.
- créer le revêtement intérieur pour le remplissage dans la restauration dentaire.
- attacher les appareils dentaires sur les dents.
- placer le nécessaire périodonta après une chirurgie périodontale.
- sceller les canaux des racines dans les traitements endodontiques.

Blackman et coll. [10] ont voulu déterminer les effets biologiques des ciments de scellement contenant de l'argent. Ils ont évalué la réponse inflammatoire des ciments à base d'argent et de verre ionomère en implantant ces composés dans les os et le tissu conjonctif tendre de rats. La réponse inflammatoire a été comparée à celle des ciments à base de ZnO et à base d'eugénol.

Après 30 jours d'implantation, les matériaux n'ont provoqué qu'une légère inflammation. Cette réponse inflammatoire est caractérisée par la présence de macrophages contenant du matériau (Ag) phagocyté, alors qu'avec l'autre ciment, la réponse est caractérisée par la présence de lymphocytes. Au bout de 80 jours, bien que la légère inflammation persiste, le matériau semble assez bien toléré. De plus, avec le temps, les auteurs observent une nouvelle formation d'os entourant le matériau. Les auteurs concluent que le ciment à base d'argent et verre ionomère peut induire certains inconvénients sans pour autant altérer

sensiblement la biocompatibilité, et peut donc être utilisé dans le processus de remplissage endodontique.

Une étude similaire *in vivo* sur les dents du chien montre que le ciment à base d'argent semble assez bien toléré par l'organisme sans aucune action nocive sur le tissu entourant les dents du chien [97].

Taoka [96] a étudié la cytotoxicité de 9 ciments de remplissage utilisés dans les méthodes de restauration et d'obturation de canaux sur des cellules dérivant de la pulpe dentaire humaine. Le ciment AH26 qui est à base d'argent en poudre fait partie de ces 9 ciments. L'auteur démontre que la cytotoxicité de 3 des ciments est immédiatement modérée puis disparaît 24 heures après le mélange, alors que les 6 autres ciments présentent des réactions de cytotoxicité de niveau moyen à élevé immédiatement après le mélange. Dans l'ordre de degré de cytotoxicité, le ciment AH26 se trouve en 4ème position.

Cette cytotoxicité [9,11] a également été étudiée par Economides et coll. [28] en testant la biocompatibilité de 4 ciments d'obturation de canal avec du tissu conjonctif de rat (AH26, Roth 811, CRCS, Scalapex). Il constate qu'au 7ème jour après implantation, le ciment le plus irritant est AH26. Cependant, cette réaction inflammatoire diminue avec le temps. L'auteur a aussi étudié leur influence sur la teneur en zinc et en calcium de plusieurs tissus. Il observe que CRCS et Roth 811 induisent une redistribution du zinc, alors que le ciment AH26 induit des modifications dans la teneur en calcium de certains organes.

2.1.3.3.2 Toxicité de l'argent *in vivo*

La toxicité de l'Ag sous forme de poudre ou granules dans les tissus périodontiques du rat n'est pas associée à une inflammation chronique. Toutefois, la présence de cellules géantes multinucléées entourant et contenant les grains d'argent a pu être mise en évidence. La réaction à l'argent du tissu périodontal se traduit donc par une légère cytotoxicité [53].

Une étude similaire [107] a été réalisée avec 3 sortes d'alliages à base d'argent en poudre contenant du cuivre en quantités diverses :

- le premier groupe Ag-Cu: 25% de cuivre
- le deuxième groupe Ag-In: 5% de cuivre
- le troisième groupe Ag-Sn-Zn: 0% de cuivre

Les résultats obtenus traduisent le même phénomène, avec apparition de cellules géantes multinucléées contenant de nombreux lysosomes, des vacuoles et du matériel d'endocytose. Watanabe [107] constate dans ces cellules des dépôts sombres composés d'un noyau central d'argent en poudre entouré de composants et de filaments fins comme une aiguille. L'auteur conclut que l'élément argent de l'alliage à base d'argent en poudre a endommagé légèrement le tissu gingival. Il constate aussi que les alliages ayant une teneur en cuivre de 0% et de 25% n'ont pas causé de dommages au tissu gingival.

2.1.3.3.3 Mécanisme d'action de l'argent

2.1.3.3.3.1 Effets sur la peroxydation lipidique

L'augmentation de la peroxydation lipidique est souvent retenue comme indicateur de toxicité. C'est pourquoi Rungby et Ernest [81] provoquent expérimentalement l'induction de la peroxydation lipidique après exposition au Cr, Hg ou Ag. La peroxydation lipidique est un processus oxydatif résultant d'une exposition croissante aux radicaux libres. C'est la malondialdéhyde (MDA, un radical libre dans la cascade de la peroxydation lipidique) qui sera suivie comme indicateur.

Les auteurs constatent qu'après une intoxication aigüe par ces métaux chez des rats, la quantité de MDA devient importante pendant 60 minutes dans les reins, puis revient à la normale; alors que dans le foie, la quantité de MDA continue à croître 48 heures après l'exposition. Ils confirment alors qu'une intoxication par l'argent induit bien la peroxydation lipidique.

Il a aussi été remarqué une synergie entre le CCl_4 et le mercure inorganique, provoquant une augmentation très importante de la peroxydation lipidique.

D'après Shinogi et Maeizumi [84], les ions Ag^+ causent un nombre important d'effets toxiques, ils diminuent les activités de la lactate déshydrogénase, du glutathion peroxydase et de la peroxydation de la membrane lipidique. Les ions Ag^+ complexent fortement les groupements sulfhydryles, et l'effet de préinduction de la métallothionéine (MT, une protéine riche en soufre) avant administration d'ions Ag^+ est largement étudié.

2.1.3.3.3.2 Action de la métallothionéine sur l'argent

La métallothionéine (MT) est une protéine de faible poids moléculaire (6800 D), omniprésente dans les tissus animaux et riche en cystéine (30-33%). De ce fait, elle a un fort pouvoir complexant voir séquestrant avec la plupart des métaux, via les groupements -SH, notamment Cd/Zn, Cu/Hg, Co et Ag.

La préinduction de MT diminue la mortalité des souris après administration de Ag^+ [84]. Les auteurs constatent que la plus grande partie de l'argent incorporé dans le foie est liée à la membrane basale et aux composants cellulaires, alors que la quantité d'argent dans le cytosol reste faible.

La préinduction de MT diminue la quantité d'Ag liée à la membrane et augmente la distribution de l'argent dans le cytosol. Liu et coll. [64] étaient arrivés à la même conclusion: la MT complexe fortement les ions Ag^+ , cette petite molécule reste donc soluble dans le cytosol. L'argent ne peut donc plus se lier avec les protéines de haut poids moléculaire de la membrane cellulaire. Le métal n'étant plus biodisponible, il ne peut plus interagir et perturber les cycles cellulaires. De ce fait, Shinogi et Maeizumi [84] constatent une diminution de la peroxydation lipidique par l'Ag dans le foie lorsque la MT est présente.

Liu et coll. [64] constatent aussi un effet protecteur de la MT sur la toxicité de divers métaux avec une diminution de la mortalité cellulaire sur des cultures primaires d'hépatocytes

de rats. Un prétraitement des cellules par $ZnCl_2$ induit la synthèse de MT et diminue de ce fait, par séquestration, la toxicité des métaux qui sont additionnés ultérieurement. Les cellules hépatiques se défendent donc d'une agression par Zn^{2+} en produisant de la MT. Les auteurs constatent aussi que le prétraitement avec Zn est plus efficace avec 3 métaux dont l'argent (les autres étant le cobalt et le nickel).

Les lymphocytes du sang périphérique humain ont aussi la capacité de produire de la MT comme réponse de protection à une exposition à différents types de métaux lourds [110]. Les auteurs étudient la toxicité des métaux en fonction de l'impact qu'ils ont sur la production de metallothionéine. Sur les 11 métaux testés, 6 ont la capacité d'induire la synthèse de MT chez les lymphocytes. Les métaux évalués comme toxiques sont le cadmium, le mercure et l'argent (ils provoquent la synthèse de MT à des concentrations relativement faibles de l'ordre $10\mu g/l$). Le cuivre, le zinc et le nickel sont moins toxiques et provoquent la synthèse de MT à des concentrations beaucoup plus élevées de l'ordre de $200\mu g/l$. L'étain, le plomb, le fer, le cobalt et le manganèse n'induisent pas de MT.

2.1.3.3.3 Action antivirale de l'argent.

L'affinité que peut avoir l'argent envers les groupements -SH pour former un complexe est étroitement liée à sa toxicité. Hussain et coll. [52] utilisent cette propriété avec les ions Ag^+ contre les virus. Les protéines liant les métaux, ou riches en cystéine, sont des composants importants des rétrovirus comme HIV car essentielles pour son expression. De ce fait, certains métaux peuvent être utilisés comme agents antiviraux. Cependant, beaucoup de métaux sont toxiques pour les humains, avec une exception, selon Hussain et coll. [52], pour l'argent qui semblerait seulement toxique pour les cellules procaryotes et les virus. De plus, l'infection par HIV cause une diminution de la cystéine dans le corps. Les auteurs constatent que l'argent est un métal bactéricide hautement actif et peu toxique pour les humains. L'argent est aussi un puissant inhibiteur de la HIV protéase. De même, la cystéine et les protéines riches en cystéine protègent les cellules de l'agression et donc les systèmes de défense.

Les auteurs ont décidé de combiner le rôle protecteur de la cystéine avec l'éventuel effet anti-viral de l'argent. Le complexe Argent-Cystéine peut augmenter la concentration en thiol dans les cellules déficientes et dans le même temps inactiver les protéines de HIV sensibles aux métaux. De plus, la cystéine protège les Na/K ATPases rénales isolées et les lymphocytes humains des effets toxiques de l'argent: la faible toxicité du complexe Argent-Cystéine semble donc intéressante pour utiliser l'argent comme agent antiviral.

Hussain et coll. [52] démontrent que le complexe Argent-Cystéine n'est pas toxique pour les lymphocytes humains sains ainsi que pour les cellules eucaryotes en général, il peut être utilisé comme agent anti-viral et comme agent de réapprovisionnement en cystéine. Il est attendu de l'argent qu'il réagisse efficacement et en interaction avec les protéines du HIV et qu'il interrompe de cette façon la réplication cellulaire du HIV à divers stades comme l'interaction avec les récepteurs membranaires, l'expression des gènes ou la biosynthèse cellulaire des virus.

2.1.3.3.4 Action antiseptique et bactériostatique de l'argent

Les effets bactériostatiques de l'argent sont utilisés contre les infections provoquées par les cathéters veineux qui représentent un important problème dans la médecine moderne. En effet, ces infections conduisent quelquefois à un traitement à vie et, par ailleurs, prolongent les durées d'hospitalisation et causent de ce fait un surcoût pour la société. Jansen et coll. [55] étudient la biocompatibilité *in vitro* et l'activité antimicrobienne d'un cathéter en polyuréthane recouvert d'Ag. D'après les auteurs, ce cathéter résiste à la colonisation, tout en gardant un effet non toxique vis-à-vis des cellules par un relargage relativement faible en argent (possibilité de complexe organo-métallique). Actuellement, un essai clinique sur le cathéter recouvert d'argent est à l'étude.

Grâce aux bactéries, il est possible d'approfondir la compréhension quant au mécanisme d'action de l'argent et la toxicité qu'il peut engendrer.

Ivanov et Fomchenkov [54] étudient les dommages engendrés par la présence des ions Ag^+ sur les bactéries *Escherichia coli*, ils constatent que l'Ag est adsorbé à la surface des cellules et qu'il en modifie les propriétés osmotiques avec une excrétion des ions K^+ de la cellule. De plus, ils constatent qu'il y a une augmentation de la toxicité de l'argent sur la membrane cellulaire lorsque le pH diminue, alors qu'une addition d'ions Mg^{2+} , Ca^{2+} et Sr^{2+} (à faible concentration), diminuent la toxicité de l'Ag.

Une interaction et une corrélation entre l'argent et d'autres ions ont pu être mises en évidence lors d'une étude traitant de la résistance aux métaux lourds sur les *pseudomonas* [101]. En effet, les auteurs démontrent qu'une souche de *pseudomonas* résistante aux ions Ag^+ l'est aussi pour les ions Hg^{2+} et Cd^{2+} , ce qui permet de suggérer une liaison possible entre la résistance envers différents ions métalliques. Cette résistance des *pseudomonas* aux ions Ag^+ a pu être mieux comprise grâce à une étude comparative avec une souche sensible à l'argent [88]. Les auteurs démontrent que la résistance n'est pas due à une complexation avec les polyphosphates intracellulaires, ou à la présence d'une protéine de faible poids moléculaire complexant les métaux. Les deux souches ont la particularité de produire du H_2S . Cependant, les auteurs constatent que la souche résistante produit moins de H_2S que la souche sensible. De plus, le niveau de sulfides intracellulaires est instable en présence d'acides et généralement plus élevé pour la souche résistante. Il est donc légitime de penser que la souche résistante utilise le soufre à d'autres fins. Les auteurs concluent, que la résistance à l'Ag est certainement due à la formation d'un complexe argent-sulfide pour la souche résistante.

Vasishta et coll. [100] indiquent que dans l'infection des plaies par brûlure, c'est la souche résistante qui colonise le plus facilement la plaie.

Des facteurs extérieurs peuvent intervenir dans la toxicité de l'argent sur les *pseudomonas*. En effet, cette toxicité dépend énormément de la concentration en NaCl du milieu de culture [35].

Il existe effectivement un équilibre entre Ag^+ et Cl^- tel que : $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \leftrightarrow \text{AgCl}$

Dont le produit de solubilité est : $P_{\text{S}(\text{AgCl})} = [\text{Ag}^+][\text{Cl}^-] = 1,77 \cdot 10^{-10}$.

AgCl est donc très peu soluble, Ag^+ et Cl^- quant à eux sont donc très étroitement liés. Si nous atteignons le produit de solubilité, une augmentation de la concentration en Cl^- implique inmanquablement une diminution de la concentration en Ag^+ avec une précipitation sous forme de AgCl pour respecter l'équilibre. Toutefois, les auteurs indiquent que la présence de NaCl n'influe pas sur la quantité d'argent accumulée par les cellules.

L'AgCl est donc incorporé de la même façon que les ions Ag^+ . Toutefois, la toxicité est fortement diminuée. Les ions Ag^+ n'étant plus aussi biodisponibles qu'auparavant, le précipité de AgCl (insoluble) est donc devenu moins toxique que les ions Ag^+ .

Le même type de phénomène a pu être remarqué par Kierans et coll. [58] lors d'une étude sur la tolérance de l'argent et de son accumulation dans les levures. L'Ag était incorporé à très faible concentration sous forme de AgNO_3 dans le milieu de culture, les ions Ag^+ étant hautement toxiques pour les levures. Les auteurs ont pu constater que la résistance à l'argent dépendait du temps d'exposition à la lumière. En effet, le rayonnement lumineux provoque la réduction des ions Ag^+ en Ag^0 . Il y a apparition de granules dans et autour des membranes cellulaires. Une analyse révèle que la composition des granules correspond à de l'argent métallique, bien que AgCl soit aussi présent dans quelques organismes. L'argent métallique tout comme AgCl est donc bien moins toxique (pour les levures) que les ions Ag^+ .

D'après Wells et coll. [108], les ions argent et les composés contenant de l'argent peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens : ils inhibent l'enzyme phosphomannose isomérase (PMI) essentielle à la biosynthèse des parois cellulaires de *Candida albicans*. Le processus est irréversible.

La Flamazine (sulfadiazine d'argent) est un antibiotique contenant de l'argent qui est utilisé cliniquement en tant qu'agent antimicrobien et antifongique. Les auteurs constatent que la Flamazine inhibe parfaitement la PMI de *Candida albicans* mais n'a aucun effet sur la PMI d'*Escherichia coli*, ce qui suggère un rôle de la seule cystéine libre dans le processus d'inhibition.

2.1.3.3.4 Action sur le métabolisme *in vivo*

Les actions de l'Ag sur le métabolisme *in vivo* ont souvent été étudiées sur des rats adultes ou à l'état fœtal. Rungby [80], dans une étude sur l'argent dans le système nerveux et sa toxicité cellulaire confirme que l'exposition à l'argent aboutit à une déposition longue et durable du métal dans de nombreuses structures du système nerveux. L'argent s'accumule d'abord dans les structures qui ne sont pas protégées par les barrières hématoencéphalique et hémotonerveuse. Il démontre aussi que l'argent peut pénétrer dans le tissu nerveux proprement dit et qu'il cause une diminution, dans les coupes transversales, des composants du tissu conjonctif des nerfs périphériques, alors que les fibres nerveuses et les gaines de myéline ne semblent pas être affectées. L'argent induit aussi une diminution du volume total des cellules pyramidales de l'hippocampe.

D'après Rungby [80], des fortes concentrations en argent induisent rapidement la mort de la cellule avec des caractéristiques ultrastructurales révélant des coagulations et des nécroses. La dénaturation chimique des protéines cellulaires est probablement causée par un

excès d'ions argent libres hautement toxiques. Des faibles concentrations aboutissent à une cytotoxicité et éventuellement à un effet cytostatique sans influence sur la structure cellulaire. Les autres fonctions macrophagiques (production de protéines, phagocytose et migration) ne sont pas affectées par l'argent à des concentrations létales pour la cellule. Il démontre aussi que l'argent s'accumule dans les lysosomes et que l'instabilité membranaire est un aspect important de la toxicité cellulaire de l'argent.

Sur le plan biochimique, l'argent entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique qui est nettement observée dans les tissus du foie. En ce qui concerne les interactions avec d'autres éléments, les effets nocifs de l'argent peuvent être renversés grâce à une addition de sélénium inorganique ; par contre le nickel associé à l'argent, provoque une synergie qui augmente très fortement la peroxydation lipidique. D'autres ions en présence de l'argent peuvent modifier les effets toxiques de ce métal *in vivo*.

Ainsi, Kazimov [57] étudie les actions combinées du cobalt et de l'argent sur des rats blancs. Il arrive aux mêmes conclusions que Rungby et indique que l'exposition combinée aux métaux semble influencer leur toxicocinétique.

2.1.3.4 Risques et biocompatibilité du cuivre

Le cuivre est, comme le fer, un élément indispensable à de nombreux processus vitaux. Il est le coenzyme de nombreuses métalloprotéines comme l'acide ascorbique oxydase et la tyrosinase. Mais son rôle principal est la stimulation de la synthèse de l'hémoglobine. Ce rôle biologique du cuivre est probablement dû à la solidité des chélates qu'il forme avec les substances biologiques actives et à ses propriétés catalytiques intrinsèques. Ses propriétés oxydoréductrices expliquent que les cupro-enzymes interviennent dans la chaîne respiratoire, au niveau de la cytochrome-oxydase probablement [30].

Les aliments contiennent naturellement du cuivre en quantité suffisante aux besoins de l'être humain; le corps en contient environ 12 milligrammes par kilogramme. L'eau potable peut contenir du cuivre; au-dessus de 1,5 mg/l, certaines personnes particulièrement sensibles peuvent constater un goût. À très faibles teneurs, les sels de cuivre présentent une saveur désagréable très marquée rendant impossible l'ingestion involontaire de quantités toxiques. Si le cuivre joue un rôle bénéfique vis-à-vis des organismes supérieurs, son comportement est totalement différent vis-à-vis des formes de vie inférieures; c'est le métal bactéricide le plus actif: un gramme de cuivre peut détruire jusqu'à 5 000 grammes de dangereux micro-organismes comme les colibacilles ou les staphylocoques dorés. L'emploi de matériaux cuivreux dans les cliniques et dans tous les édifices publics améliorerait la prophylaxie des infections.

Il semble que l'effet du cuivre soit non seulement fongicide, mais aussi nécessaire à la croissance de nombreuses plantes. Le cuivre est trop souvent considéré comme un métal toxique. En fait, il n'existe pas de maladie professionnelle reconnue du cuivre. Nécessaire à la vie, ce métal semble jouer un rôle important dans la formation de l'hémoglobine du sang.

2.1.3.4.1 Biocompatibilité du cuivre métallique et ionique

La cytotoxicité du cuivre dépend également de la forme sous laquelle il se trouve.

2.1.3.4.1.1 Cytotoxicité du cuivre métallique

Afin de rechercher la biocompatibilité des métaux les plus utilisés, des tissus gingivaux ont été mis en contact avec 9 métaux purs, comme le platine, l'or, le cuivre... Les poudres de ces métaux purs ont été introduites dans de petites cavités creusées dans la racine de maxillaires chez des rats. Les résultats obtenus sont les suivants: les poudres de cuivre et de nickel sont à associer avec une inflammation chronique des cellules avec présence de lymphocytes et leucocytes neutrophiles occasionnels. De plus, le cuivre et le nickel causent des dommages considérables dans les tissus gingivaux [53].

Nous pouvons donc conclure de ces observations que le cuivre métallique présente une cytotoxicité pour les tissus animaux, sans pour autant présenter de mutagénicité.

2.1.3.4.1.2 Cytotoxicité de l'ion Cu^{2+}

L'influence des ions de métaux lourds (Ag^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) sur les cellules de *Anacystis nidulans* et *Escherichia coli* a été étudié par des méthodes d'électrophorèse et de spectroscopie d'électro-orientation. Il a été montré que les changements de la mobilité électrophorétique des cellules (EM) et que l'effet d'électro-orientation (E.O.E.) à basse fréquence (20 Hz), observés avec l'augmentation de la concentration en cation métallique, caractérisent l'adsorption de ces ions sur les couches superficielles des enveloppes cellulaires. Le degré et la nature de ces changements dépendent de la valence des cations et de la valeur initiale de l'EM des cellules. En même temps, les différents changements de l'EM et de l'E.O.E., résultant de l'adsorption de cations multivalents, permettent de conclure, que dans ce cas, l'anisotropie de la surface des cellules augmente.

Les dommages cellulaires sont déterminés par des changements dans l'E.O.E. haute fréquence des cellules, qui indiquent le désordre des propriétés barrières de leur membrane cytoplasmique.

Les effets toxiques de Ag^+ , Cu^{2+} et Cd^{2+} sur les cellules des deux espèces, et de Pb^{2+} sur les *Escherichia coli* sont observables.

Ces ions peuvent être rangés selon leur cytotoxicité dans l'ordre suivant:

- pour *A. nidulans*: $Ag^+ > Cu^{2+} > Cd^{2+}$
- pour *E. coli*: $Ag^+ > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$

La plus grande toxicité des métaux lourds sur *E. coli* semble être en rapport direct avec la charge plus fortement négative des couches profondes de la surface des cellules [54].

On peut donc conclure de cette étude que les ions Cu^{2+} présentent une cytotoxicité pour les cellules bactériennes.

2.1.3.4.1.3 Génotoxicité du cuivre dans un complexe moléculaire

La génotoxicité du cuivre a été étudiée par l'intermédiaire de 4 tests microbiens: test Ames, test *E. coli* WP2, test Mutatox (déTECTANTS la mutagénicité) et le test SOS avec *E. coli* (déTECTANT les enzymes d'induction). Les résultats de cette expérimentation ont donné le cuivre comme génotoxique et causant des effets mutagènes par les tests Mutatox et SOS avec *E. coli* [21].

Le chromate et le dichromate de cuivre (II) complexés avec le 2,2'-bipyridyl et le 1,10-phénathroline sont testés par le test Ames. Le résultat de ce test montre que l'activité mutagénique de ces complexes est plus basse que celle de la référence composée de dichromate de potassium et de chromate de sodium [94].

A priori, le cuivre complexé perdrait son pouvoir mutagénique ou tout au moins son action génotoxique. Cette conclusion est également mise en évidence dans une étude réalisée sur la complexation du cuivre (II), dont les propriétés génotoxiques disparaissent dans le complexe [18]. Malgré tout, ce résultat reste à confirmer.

D'après toutes ces observations [42,78,82], nous pouvons avancer que le cuivre métallique ou ionique utilisé seul présente une activité cytotoxique mais non mutagénique pour les cellules animales et bactériennes, et l'utilisation du cuivre dans un complexe moléculaire inhibe toute activité génotoxique du ligand.

2.1.3.4.2 Mécanisme d'action du cuivre

2.1.3.4.2.1 Rôle du cuivre dans les cytochromes

L'oxydase du cytochrome-C est le transporteur final d'électron dans la chaîne respiratoire des mitochondries ainsi que dans les chaînes respiratoires de nombreuses bactéries. Elle contient 3 centres red/ox :

- un cuivre A (CuA) hème de spin faible
- deux cuivre B (CuB) hèmes dinucléaires de spin fort

Les 2 hèmes CuB sont localisés dans le sous-unité I alors que le CuA est localisé dans le sous-unité II [31].

Pour identifier les ligands du CuA, tous les ligands du domaine CuA dans *Paracoccus denitrificans* ont été substitués. Seulement 5 résidus Cys-244, Cys-248, His-209, His-252, Met-255 ont été exigés pour un assemblage correct du centre CuA. Le remplacement de la Met-255 provoque la formation d'une protéine mal « pliée ». Par conséquent, la méthionine peut avoir un rôle structural pour la conformation spatiale de la protéine plutôt que d'être un ligand du CuA [31].

Une autre étude suggère qu'une conformation spatiale précise dans l'environnement du site CuA à l'intérieur de la sous-unité II est essentiel pour l'assemblage ou l'accumulation stable de l'oxydase du cytochrome C dans la levure de *Saccharomyces cerevisiae* [90].

2.1.3.4.2.2 Rôle du cuivre dans la chlorophylline

La chlorophylline est un sel de sodium et de cuivre, présent dans la chlorophylle des plantes. La chlorophylline a une action inhibante sur le pouvoir mutagénique du NOP (4-nitro-o-phénylénédianine). Son action se manifeste lorsque la chlorophylline est utilisée seule, mais aussi lorsqu'elle est combinée naturellement dans la chlorophylle totale [37].

Outre son activité antimutagénique, la chlorophylline possède un pouvoir anticancérogène. L'étude menée porte sur la formation de liaisons entre l'ADN et l'aflatoxine B1, un agent cancérogène, dans le foie de truite. D'après les expériences réalisées, la chlorophylline est capable de détruire jusqu'à 70% des liaisons ADN-aflatoxine B1 responsables de la cancérisation du foie de truite. Ce pouvoir n'est cependant pas vérifié dans tous les cas de carcinomes [26].

Le mécanisme d'action de la chlorophylline consiste en la formation d'un complexe avec la molécule à neutraliser. C'est dans ce mécanisme que le cuivre intervient, par l'intermédiaire du groupement chlorure-cuivre. En effet, ce groupement adsorbe la molécule type aflatoxine-B1, et permet la complexation de cette dernière avec la chlorophylline [2]. Malgré tout, le métal central ne joue pas un rôle crucial dans l'adsorption. En effet, la même expérience menée avec chlorure-fer et chlorure seul, donne des résultats équivalents à ceux obtenus avec le cuivre.

Les enzymes des cytochromes P450 apparaissent comme étant des catalyseurs majeurs de la bioactivation des agents cancérogènes. L'effet de la chlorophylline sur plusieurs activités de l'enzyme P450 a été testé *in vitro*. Cette étude met en évidence que la chlorophylline inhibe de façon non spécifique toutes les activités observées de l'enzyme.

Ces résultats suggèrent que l'effet antigénotoxique de la chlorophylline pourrait être dû à l'inhibition des enzymes P450 impliquées dans la bioactivation d'agents cancérogènes, par la formation de complexes moléculaires entre l'agent cancérogène et la chlorophylline. C'est le mécanisme dominant de l'inhibition [113].

2.1.3.5 Action mutagène

Le potentiel mutagène des ciments dentaires destinés à l'obturation des racines a été étudié par Stea et coll. [91]. Cette étude est réalisée par le test de Ames sur 12 ciments dentaires (dont le AH26), le ZnO et l'eugénol (2 substances pures). Le test de Ames est réalisé sur des extraits en utilisant des cultures de *Salmonella typhimurium*.

Les auteurs remarquent que la plupart des ciments ont une forte activité bactéricide qui diminue rapidement avec le temps. Nous constatons que l'un des ciments, le AH26, montre un effet mutagène et que deux d'entre eux conduisent à des résultats douteux. Le ZnO et l'eugénol, quant à eux, n'ont pas d'effet mutagène. Les auteurs concluent qu'il serait pratique d'examiner les ciments endodontiques avec le test de Ames afin d'éliminer ceux qui présentent des effets mutagènes. Il serait donc intéressant de savoir si le test de Ames peut être utilisé sur les métaux et alliages dentaires à base de Pd-Ag.

La mutagénicité du ciment AH26 a aussi été étudiée par Schweikl et coll. [85] sur des cellules V79/HPRT (hypoxanthine phosphorybosyl transferase) de mammifères. Nous constatons que la toxicité et la mutagénicité du ciment AH26 dépendent du temps d'incubation au contact des cellules. Les effets sont fortement atténués après une semaine. Les solutions salines de AH26 sont toxiques à haute dose mais non mutagènes. L'extrait de AH26 avec le diméthylsulfoxyde provoque les mêmes effets mutagènes que le matériau fraîchement mélangé.

Les auteurs concluent que les cellules V79/HPRT peuvent être utilisées pour évaluer la mutagénicité des matériaux dentaires.

En ce qui concerne le palladium, les problèmes de mutagénicité sont très rarement traités. Cependant, Yuriku et Masatoshi [114] abordent le sujet dans un article dont le titre est « l'activité mutagénique des complexes de platine et palladium ». Néanmoins, l'activité mutagénique des complexes du Pd n'est pas réellement abordée, tant dans le texte que dans les références. A notre connaissance, il n'existe pas d'autres travaux dans ce domaine.

Quand à l'action mutagène du cuivre, elle est assez complexe et plutôt indirecte :

Le peroxyde de benzoyl (BzPO) est un initiateur de tumeur et permet leur développement dans la peau des souris. Cette action est présumée être causée par des radicaux libres dérivés de BzPO. Les dommages causés par le BzPO sur l'ADN nécessitent l'intervention du cuivre. [93].

Les clivages de l'ADN sont causés par la potentialisation de l'action des agents mutagènes par le cuivre. L'action du cuivre est donc indirecte. Pour certains chercheurs, c'est le cuivre (II) qui agit [77], et pour d'autres, ce sont les deux espèces cuivre (I et II) qui ont un rôle à jouer [98].

Le cuivre (I) et H_2O_2 ont un rôle important dans la production d'espèces actives oxygénées causant des dommages sur l'ADN. H_2O_2 provient de l'action de NADH avec le dioxygène. Ils forment dans un premier temps un superoxyde, et ultérieurement H_2O_2 , lequel est activé par les métaux de transition pour causer des dommages sur l'ADN [68].

Les mutations induites par le cuivre ne sont pas distribuées au hasard. La forte fréquence de liaisons C-T dans la séquence nucléotidique de l'ADN pourrait être une manifestation des mutations causées par les radicaux oxygénés [98].

Finalement, nous pouvons conclure que le cuivre quelle que soit la forme utilisée, ne présente pas directement d'action mutagénique. Néanmoins, son action indirecte en tant qu'activateur de radicaux libres est à prendre avec la plus haute considération si nous voulons l'utiliser chez l'homme. D'autre part, cet élément ne présente pas que des dangers, puisqu'il est un des composants de la chlorophylline, un antimutagénique reconnu.

2.1.3.6 Conclusion

Le palladium et ses dérivés peuvent donc induire des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques, en agissant via les groupements -SH, essentiellement lorsqu'il s'agit des sels de palladium et plus particulièrement des dérivés organiques. Le métal, par contre, ne présente pas d'effets toxiques très marqués. De même, les réactions de sensibilisation ou d'allergie induites suite à la présence de restaurations dentaires à base de palladium, restent extrêmement rares.

L'argent, quant à lui, présente de nombreux effets toxiques et tout particulièrement sur les procaryotes et les virus qui comportent de nombreuses protéines soufrées. L'argent est d'ailleurs utilisé comme agent antiviral. Par contre, son effet toxique est bien moins important sur les eucaryotes, notamment des cellules humaines.

La grande affinité pour les groupements soufrés est à la base des effets biologiques de l'argent. Ceci lui permet d'intervenir sur la cascade de la peroxydation lipidique en provoquant des effets toxiques. Cette même affinité pour les groupements -SH peut avoir aussi un effet protecteur lorsque la complexation de l'argent rend celui-ci moins biodisponible pour le cycle cellulaire.

Cependant, le premier facteur de risque dans la toxicité d'un alliage est fonction de sa solubilité. Le métal est bien moins toxique que son sel dont les ions peuvent interagir bien plus facilement avec les molécules des cycles cellulaires et créer ainsi de fortes perturbations. Le résultat de cette étude indique que la toxicité d'un élément à part entière, tel que l'argent, le cuivre ou le palladium, est fonction du milieu d'où il provient et de celui dans lequel il se retrouve : effet de synergie avec d'autres éléments, complexation et biodisponibilité. La toxicité d'un élément ne peut donc être un critère suffisant pour déterminer la toxicité d'un alliage. L'étude de l'alliage en lui-même, et non pas seulement des éléments chimiques le constituant, doit être effectuée pour déterminer sa toxicité.

2.2 PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES

2.2.1 Les éléments d'alliages

2.2.1.1 Le palladium

Le Palladium, élément chimique de symbole Pd et de numéro atomique 46 est un métal blanc (ou blanc léger), de densité 12,03, sa température de fusion est de 1552°C. Dur et ductile, malléable, il ne peut pas être fondu à l'air. C'est un métal réfractaire qui s'allie facilement à l'or car les diamètres atomiques sont proches. C'est un sous-produit de la métallurgie du nickel, du raffinage de l'argent et du cuivre [7]. Le palladium provient de la mine du platine (Pt). Pour les chimistes, le platine a toujours été un sujet d'études fructueuses. Ils reconnaissent qu'il est accompagné le plus souvent, dans la nature, de métaux aux propriétés voisines qu'on appelle les platinoïdes, ou métaux de la mine du platine. Ce sont le palladium (Pd), le rhodium (Rh), l'iridium (Ir), le ruthénium (Ru) et l'osmium (Os). Aujourd'hui, par suite de leurs propriétés uniques et malgré leurs prix très élevés, les platinoïdes sont essentiellement employés dans l'industrie, et seule leur rareté vient limiter le développement de leurs utilisations.

On trouve le platine à l'état natif en Colombie, en Alaska, en Ethiopie, aux Philippines, etc., inclus dans des roches magmatiques ultrabasiques ou concentré localement dans les sables et graviers alluviaux produits par la désagrégation de ces roches. Cette source n'assure plus guère à l'heure actuelle que 2% de la production mondiale. Celle-ci provient presque exclusivement de minerais très complexes où dominant le fer, le nickel et le cuivre, dont les principaux gisements se trouvent en Sibérie, au Canada et en Afrique du Sud. Le palladium domine dans les minerais russes et le platine dans les minerais africains [30].

2.2.1.1.1 Propriétés

Les platinoïdes ont des propriétés chimiques très voisines, ce qui rend leur séparation difficile. Leur caractère le plus apparent est leur inaltérabilité. La mise en solution de ces métaux est donc très laborieuse et exige l'utilisation de réactifs spéciaux, particulièrement agressifs. Une fois en solution, les platinoïdes peuvent former d'innombrables sels «complexes». Ces métaux facilitent ou orientent de très nombreuses réactions chimiques par leur simple présence (pouvoir catalytique). Les platinoïdes sont des métaux réfractaires. Leurs points de fusion vont de 1 554 °C pour le palladium à 3 056 °C pour l'osmium. Le platine fond à 1 772 °C. Par leurs densités, les platinoïdes se divisent en deux sous-groupes: des densités comprises entre 12 et 12,45 pour le ruthénium, le rhodium et le palladium, d'une part, et des densités respectives de 21,45 - 22,61 et 22,64 pour le platine, l'osmium et l'iridium, d'autre part.

Tableau 2 : Le palladium.

Couleur :	Blanc léger
Symbole chimique :	Pd
Numéro atomique:	46
Masse atomique:	106,4
Point de fusion:	1552°C
Point d'ébullition:	3980°C
Densité (à 20 °C):	12,0
Système cristallin :	CFC
Rayon atomique :	1,37 Å
E° [PdCl ₄] ²⁻ /Pd :	0,591 V

Le platine et le palladium sont des métaux extrêmement ductiles et malléables. Ils se prêtent particulièrement bien à l'obtention de fils fins et de bandes laminées minces. Les techniques de la chaudronnerie traditionnelle permettent d'en faire des récipients aux formes variées. Le palladium sur charbon actif est utilisé comme catalyseur dans l'industrie pharmaceutique. Les métaux précieux sont biocompatibles, aussi sont-ils des matériaux de choix pour la médecine. Le palladium et les alliages palladium/or sont utilisés en prothèse dentaire. Le palladium est utilisé, le plus souvent allié à l'or ou à l'argent, pour la réalisation de contacts électriques.

2.2.1.1.2 Propriétés chimiques

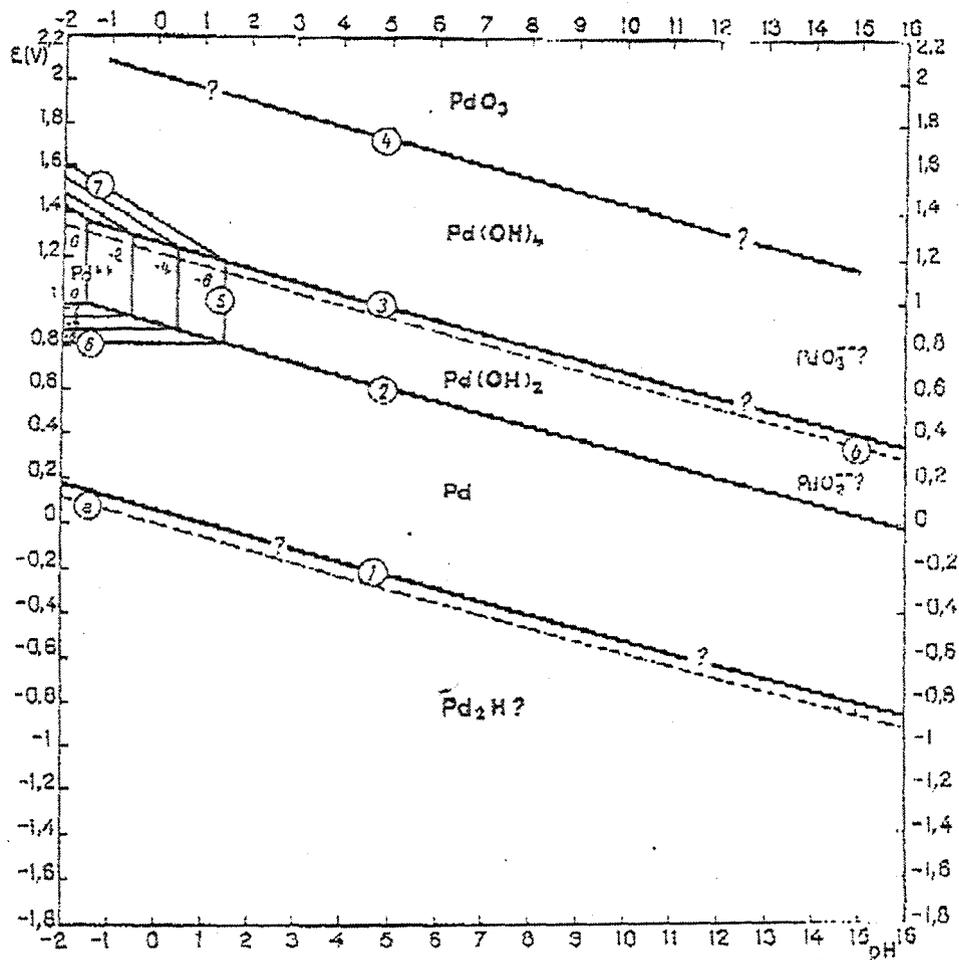


FIG. 1. Potential-pH equilibrium diagram for the system palladium-water, at 25°C.

Figure 3 : Diagramme de Pourbaix du Pd.

2.2.1.1.3 Le Palladium dans un alliage.

Le palladium remplace le platine qui est cinq fois plus cher environ et dont les propriétés sont voisines. Il a un pouvoir blanchissant important : 5% de palladium confère à un alliage d'or sa couleur blanche. Il y a décroissance linéaire de la taille des grains avec l'augmentation de la proportion de palladium, et augmentation de la température de fusion de l'alliage, ainsi qu'une diminution du coefficient d'expansion thermique. La résistance à la traction, la dureté, la rigidité, et le module élastique de l'alliage augmentent de façon significative avec la proportion de palladium, notamment à partir de 30% en poids. Le palladium augmente la résistance à la corrosion, et contribue à réduire la sulfuration de l'argent, cause du ternissement de l'alliage [7].

Quand la teneur en palladium est supérieure à 35%, il y a augmentation de la température de fusion et élargissement du domaine des températures de solidification, ce qui peut entraîner des défauts de remplissage du revêtement lors de la coulée. Le palladium dissout facilement le carbone, l'oxygène et l'hydrogène à haute température, d'où un risque de fragilité par formation de porosités. L'oxygène dissout provoque une oxydation interne de certains éléments de l'alliage tels l'étain et l'indium. Le palladium ne participe pas à la liaison métal-céramique car ses oxydes sont instables à haute température. [7]

2.2.1.2 L'argent

L'argent, élément chimique de symbole Ag et de numéro atomique 47, est l'un des métaux les plus anciennement connus. Il semble cependant que sa découverte soit postérieure à celle des deux autres métaux de la même famille chimique: l'or et le cuivre. Dès la première dynastie égyptienne, vers 3500 avant J.-C., sa rareté, son blanc très pur et son inaltérabilité le faisaient employer comme monnaie, sa valeur étant supérieure à celle de l'or. L'histoire de ce métal est intimement liée à celle de l'alchimie: ainsi, c'est la coupellation, opération dans laquelle le plomb semble se transformer en argent, qui donne vraisemblablement naissance aux théories des alchimistes. Les alliages d'argent remontent aussi à la plus haute antiquité: certains d'entre eux (par exemple l'électrum, alliage d'or et d'argent) existent à l'état natif. Au contraire, les sels d'argent ont été longtemps ignorés, sauf le chlorure, qui existe à l'état naturel. Il fut préparé au XVI^e siècle par Paracelse à partir du métal. Carl Wilhelm Scheele a étudié l'action des rayons lumineux sur le chlorure et la découverte de la photographie a attiré l'attention sur les autres halogénures. Après le chlorure, le nitrate est le sel le plus anciennement connu. Il a été fondu et coulé en 1663 par Christopher Glaser, constituant la «pierre infernale» utilisée comme cautérisant.

Tableau 3 : L'argent.

Couleur :	Blanc
Symbole chimique :	Ag
Numéro atomique:	47
Masse atomique:	107,87
Point de fusion:	961,9°C
Point d'ébullition:	2212°C
Densité (à 20 °C):	10,5
Système cristallin :	CFC
Rayon atomique :	1,44 Å
E° Ag/AgCl :	0,22 V

La production mondiale d'argent est de l'ordre de 10 000 tonnes par an dont plus de la moitié est absorbée par le Fonds monétaire international. En France, la bijouterie et l'orfèvrerie utilisent environ 50 p. 100 du métal non monétisé. L'argent cesse de plus en plus d'être exclusivement un métal précieux pour devenir un métal industriel. Mais les besoins de l'industrie augmentent plus vite que l'extraction minière, ce qui explique la hausse continue des cours. Les principaux pays producteurs sont le Mexique, le Pérou, l'ex-Union Soviétique, le Canada et les États-Unis.

L'argent est disséminé sur toute la surface de la Terre. C'est cependant un métal très rare qui ne vient qu'au 63^e rang dans l'ordre d'abondance des éléments de l'écorce terrestre. Il existe aussi dans l'eau de mer à une concentration correspondant sensiblement à la solubilité du chlorure (10^{-5} g/l). Il a également été signalé dans les pierres météoriques.

Les principales espèces minéralogiques considérées comme minerais possibles d'argent se répartissent en trois groupes:

- L'argent *natif*, très rarement en quantité notable, ne constitue pas une source importante de métal. Le gisement le plus important se trouve dans la région de Kongsberg, en Norvège. L'argent natif est le plus souvent allié à d'autres métaux, notamment l'or (électrum), le mercure et surtout l'antimoine (dyserasite, qui contient environ 75% d'argent).
- Les minerais *sulfurés*, *sélénisés* et *tellurés* sont des minerais de profondeur et constituent la source la plus importante d'argent. Le principal est l'argentite, Ag₂S

(Chili, Pérou, Nevada, Mexique). Le plus souvent, le sulfure d'argent est associé en petites quantités aux sulfures de plomb, d'antimoine (stéphanite, pyrargyrite), d'arsenic (proustite), de cuivre (polybasite). Ces minerais se trouvent principalement en Amérique du Nord.

– Les minerais *halogénés* se rencontrent surtout dans les affleurements. Le plus important est le chlorure (cérargyrite), que l'on trouve au Mexique et au Pérou.

Ces espèces chimiques sont mélangées à de grandes quantités de divers minéraux, et la récupération de l'argent comme sous-produit d'autres procédés métallurgiques dépasse maintenant la production du métal à partir de ses minerais propres. La galène est presque toujours argentifère. Le minerai devient exploitable à partir de 500 grammes d'argent à la tonne. Nous le rencontrons également dans les pyrites et les blendes.

2.2.1.2.1 Propriétés physiques

L'argent de couleur blanc brillant cristallise dans le système cubique. La maille élémentaire est cubique à faces centrées et son paramètre cristallin est de 0,407 nm. Sa masse volumique est voisine de 10,5. kg/m³ à la température ordinaire. La température de fusion est de 961,9 °C. La température de vaporisation est de 2 212 °C.

De tous les éléments l'argent est le meilleur conducteur de la chaleur (conductivité supérieure de 8 % à celle du cuivre). Sa conductivité thermique est égale à 420 W m⁻¹ K⁻¹.

Du point de vue optique, l'argent poli possède un pouvoir réflecteur très élevé dans l'infrarouge et sensiblement plus faible dans l'ultraviolet. C'est principalement cette raison qui fait préférer l'aluminium à l'argent dans les miroirs de télescopes. Son pouvoir émissif est très faible, vraisemblablement l'un des plus bas de tous les éléments.

L'argent est également le meilleur conducteur de l'électricité. Sa résistivité est d'environ 95% de celle du cuivre. L'argent est nettement diamagnétique.

2.2.1.2.2 Propriétés mécaniques

L'argent est un métal relativement mou. Sa dureté dans l'échelle de Mohs est comprise entre 2,5 et 3, sensiblement égale à celle du cuivre. Elle est notablement augmentée par l'addition de petites quantités de cuivre. Les autres propriétés mécaniques sont également très affectées par des traces d'impuretés.

Un phénomène très important est la solubilité des gaz dans l'argent, en particulier de l'oxygène. À l'état solide et sous la pression atmosphérique, la solubilité est de l'ordre de 1,3 . 10⁻² cm³/g, c'est-à-dire relativement élevée. Elle passe par un minimum à 400 °C (0,8 . 10⁻² cm³/g) et elle atteint 3 . 10⁻² cm³/g à 800 °C. À l'état liquide, la solubilité est extraordinairement élevée puisqu'au voisinage de sa température de fusion l'argent peut dissoudre près de 25 fois son volume d'oxygène.

C'est vraisemblablement l'argent qui, de tous les métaux fondus, peut dissoudre le plus d'oxygène. Au voisinage de la température de fusion, la solubilité à l'état liquide est

40 fois supérieure à la solubilité à l'état solide. Il en résulte qu'en se solidifiant l'argent libère l'oxygène dissous. C'est le phénomène de rochage. Nous pouvons éviter le rochage par l'application d'une pression extérieure suffisante ou au moyen de désoxydants, par exemple le cuivre.

2.2.1.2.3 Propriétés chimiques

L'argent est le plus réactif des métaux dits nobles. L'action de l'oxygène à la température ordinaire conduit à la formation d'un film superficiel dont l'épaisseur ne dépasse pas un nanomètre environ.

L'argent se distingue très nettement de ses partenaires du groupe *Ib*. En effet, les coordinations habituelles pour le cuivre et l'or sont 2 et 4, les plus importantes étant 4 pour le cuivre et 2 pour l'or. L'argent adopte indifféremment les coordinations 2, 4 et 6, et la coordination 3 peut aussi exister.

L'argent peut se rattacher, d'une part, à l'or et au cuivre, qui constituent avec lui le groupe *Ib* de la classification périodique et d'autre part, au palladium, qui est son voisin dans la deuxième série des éléments de transition ainsi qu'au rubidium qui est son homologue du groupe *Ia*.

En fait, par ses propriétés physiques, l'argent se rattache surtout à l'or et au cuivre et, par ses propriétés chimiques, au palladium. La masse atomique de l'argent est de 107,868.

L'argent donne naissance à trois ions Ag^+ , Ag^{2+} et Ag^{3+} , les trois premiers potentiels d'ionisation étant respectivement 7,54 eV, 21,4 eV et 35,9 eV. Nous remarquerons en particulier la valeur très élevée du deuxième potentiel d'ionisation qui est à l'origine de la préférence très marquée de l'argent à adopter la valence 1. L'ion Ag^+ est incolore. Son rayon ionique est de l'ordre de 0,16 nm. Il est diamagnétique. Les potentiels d'oxydation en solution acide (pH 1) sont :

$$\begin{aligned} &0,8 \text{ V pour } \text{Ag}^+/\text{Ag}, \\ &1,98 \text{ V pour } \text{Ag}^{2+}/\text{Ag}^+ \\ &2 \text{ V pour } \text{Ag}^{3+}/\text{Ag}^{2+}. \end{aligned}$$

2.2.1.2.4 Applications de l'argent et de ses sels

Dans les alliages d'argent, par addition d'un métal étranger, on cherche à remédier aux deux défauts principaux de l'argent: le manque de dureté et la réactivité vis-à-vis du soufre et des sulfures. L'accroissement de la résistance mécanique est généralement obtenu par addition de cuivre. Les principaux alliages sont les alliages d'orfèvrerie à 7,5% et 10% de cuivre. Ils sont également utilisés dans l'industrie électrique, car la conductivité de l'argent est peu altérée. L'accroissement de la résistance vis-à-vis du soufre et des sulfures est obtenu par addition de cadmium, de zinc ou d'antimoine, mais la couleur de l'argent est presque toujours altérée. Les alliages ternaires, notamment argent-cuivre-zinc, sont utilisés pour la brasure. Les alliages avec l'or et les métaux précieux (palladium, platine) sont employés en orfèvrerie et dans l'art dentaire.

2.2.1.2.5 L'argent dans un alliage.

L'argent ne présente d'intérêt que d'un point de vue économique, et ne doit figurer qu'en petite quantité dans les alliages palladiés car ce métal provoque un verdissement de la céramique.

Une faible proportion d'argent (moins de 5%) permet d'augmenter le coefficient de dilatation thermique de l'alliage ainsi que sa coulabilité, sans nuire à la teinte de la céramique. A partir d'une proportion de 45%, l'argent engendre, de plus, un ternissement de surface qui se traduit par un effet esthétique défavorable, voire même par une inflammation locale des muqueuses [14]. Ce métal augmente légèrement la dureté de l'alliage, et possède un fort effet blanchissant, il assure la ductilité dans les alliages Pd-Ag.

A l'état liquide, l'argent absorbe aussi l'oxygène de l'air qu'il rejette au cours de la solidification de l'alliage (phénomène appelé rochage de l'argent), ce qui peut engendrer des porosités au sein de l'alliage. Les oxydes d'argent, instables à haute température, ne participent donc pas à la couche d'oxydes qui permet la liaison métal-céramique. Les alliages à forte teneur en argent présentent une résistance à la corrosion inférieure à celle des alliages à plus faible teneur, ou n'en contenant pas du tout [7].

2.2.1.3 Le cuivre

Le cuivre, élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique 29. Parce qu'il existe, comme l'or et l'argent, à l'état natif, le cuivre est l'un des métaux les plus anciennement connus. Des objets de cuivre datant du neuvième millénaire avant J.-C. ont été mis à jour en Irak. Sa métallurgie semble dater du cinquième millénaire, et nous pouvons parler d'un âge du cuivre antérieur à l'âge du bronze.

Les propriétés déterminant les emplois du cuivre et de ses alliages sont, par ordre d'importance:

la conductivité électrique, la résistance à la corrosion, la conductivité thermique, la malléabilité, l'aptitude au soudage et au brasage, les propriétés fongicides.

Le cuivre est assez irrégulièrement réparti à la surface du globe. Nous trouvons les grands gisements au sud du Bouclier canadien, dans le Michigan et le Montana, ainsi que dans le sud-ouest des États-Unis, au nord du Mexique, dans les Andes occidentales, Pérou et Chili (Chuquicamata et El Teniente), sur la plate-forme africaine (Zaïre et Zambie), en Afrique du Sud (Transvaal) et en Australie, à l'intérieur du Queensland, en Asie (Chine, Papouasie-Nouvelle-Guinée, Philippines, Indonésie),

La teneur des minerais exploités varie de 0,5% à 6 %, valeurs extrêmes. En pratique, un minerai contenant au moins 1,8 % de cuivre est considéré comme riche, comme pauvre en dessous de 1 %.

2.2.1.3.1 Propriétés du cuivre

Le cuivre de couleur rouge cristallise dans le système cubique à faces centrées ($a = 0,366$ nm). C'est, après l'argent, le meilleur conducteur de la chaleur et de l'électricité, sa densité est de 8,96, sa température de fusion de 1083 °C. Le cuivre est très malléable et très ductile.

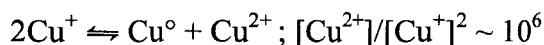
2.2.1.3.2 Propriétés chimiques

Le cuivre précède l'argent et l'or dans le sous-groupe *b* de la première colonne du tableau périodique des éléments. Neuvième des dix éléments de transition compris entre le calcium et le gallium, il est le premier à posséder une sous-couche 3*d* complète [73]. L'arrangement des électrons implique que le cuivre est normalement monovalent, et les sels cuivreux ressemblent en effet aux sels d'argent, auxquels ils sont souvent mêlés dans la nature. L'oxyde, le sulfure et les halogénures cuivreux ont une structure covalente prédominante. Ils cristallisent dans le système cubique du type de celui de la blende. Les halogénures sont facilement fusibles et sont semi-conducteurs. L'ion Cu⁺ est incolore et

Tableau 4 : Le Cuivre.

Couleur :	Rouge brun
Symbole chimique :	Cu
Numéro atomique:	29
Masse atomique:	63,54
Point de fusion:	1083°C
Point d'ébullition:	2595°C
Densité (à 20 °C):	8,96
Système cristallin :	CFC
Rayon atomique :	0,128 nm
E° Cu/Cu ²⁺ :	0,34 V

diamagnétique. En raison de son rayon important (0,091 nm), il ne donne pas d'hydrates et ses complexes sont peu stables. D'une façon générale, les sels cuivreux sont instables en solution en raison de l'équilibre:



Métal noble, le cuivre, à l'inverse du fer, du zinc et du plomb, ne déplace pas l'hydrogène de ses solutions, et n'est donc pas soluble dans les hydracides. Il est soluble, en revanche, dans les acides oxydants (acide nitrique, acide sulfurique concentré et chaud). L'ammoniaque le dissout également en donnant une solution bleue connue sous le nom de « liqueur de Schweitzer ». Le cuivre résiste bien à la corrosion atmosphérique et marine; une longue exposition entraîne la formation d'une fine couche de carbonate basique d'un beau vert. C'est la patine de certains toits.

Les prix de revient du cuivre varient dans de très larges proportions suivant les mines: il dépend, en particulier, du coût de la main-d'œuvre. Les sous-produits des gisements de cuivre tels que l'or, l'argent, le cobalt, le molybdène ont pris une importance croissante.

2.2.1.3.3 Le cuivre dans un alliage.

Il donne à l'alliage la couleur or. Présent en faible quantité dans les alliages d'or (moins de 2%), où il pose des problèmes de liaison et de coloration de la céramique, nous le retrouvons en quantité plus importante (jusqu'à 14,5%) dans les alliages à haute teneur en palladium, où ces problèmes n'apparaissent pas. Le cuivre, présent à des teneurs avoisinant 10% en poids dans un alliage Au-Pd-Ag, diffuse dans l'opaque sur des distances importantes (au-delà de 100 μm) [7]. Brugirard [14] pense que le cuivre est à proscrire dans les alliages destinés à la céramique. Il est alors remplacé par l'étain, l'indium, ou le gallium.

Dès lors que sa teneur est supérieure à 10% en poids, la présence de platine compense les effets indésirables du cuivre tels que la diminution de la résistance à la corrosion. La présence de cuivre dans les alliages Pd-Ag aboutit à la formation d'une structure hétérogène à deux phases qui favorise la formation des sulfures d'argent, et donc le ternissement et la corrosion [7].

2.2.1.4 L'or

À l'état fondamental, l'or, de symbole chimique Au et de numéro atomique 79, est caractérisé par la saturation de la sous-couche *5d* et la présence d'un électron célibataire en *6s*. En fait, l'effet écran très limité de la sous-couche *5d* entraîne pour le noyau une charge effective élevée: de tous les éléments dont la sous-couche périphérique ne comporte qu'un seul électron, l'or est celui pour lequel cet électron est le plus stable : le premier potentiel d'ionisation de l'or est de 9,22 eV, alors que celui de l'argent n'est que de 7,57 eV et celui du potassium de 4,34 eV. Il en résulte pour l'or une tendance très marquée à se trouver à l'état métallique. Cette tendance commande pour l'essentiel ses propriétés et celles de ses composés. La propension de l'or à se trouver à l'état métallique explique également que dans la nature il se trouve toujours sous forme élémentaire soit pur, soit à l'état d'alliages, avec l'argent et le tellure généralement. Il est largement dispersé à l'état naturel, mais presque toujours en proportions trop faibles pour qu'une exploitation moderne soit possible. Les gisements sont constitués de roches dans lesquelles l'or est disséminé, les *filons aurifères*, et des dépôts alluviaux ou *placers* provenant de leur érosion, où l'or se trouve sous forme de pépites. Les principaux producteurs d'or sont l'Afrique du Sud et l'Union Soviétique [30].

L'or est connu depuis la plus haute antiquité. Il est sans doute le premier métal travaillé par l'homme. Il fit son apparition dès le Néolithique sur le pourtour oriental de la Méditerranée sous forme de bijoux et de décorations tombales. L'or en circulation est généralement allié au cuivre, qui en augmente la dureté. L'or «à 24 carats» est exempt de cuivre.

2.2.1.4.1 Propriétés physiques et mécaniques

L'or est un métal jaune de structure cubique à faces centrées. Le rayon atomique (0,144 nm) est le même que celui de l'argent, son homologue de la colonne I B, analogie due à la «contraction lanthanidique». La similitude de structure et de rayon atomique explique d'ailleurs que l'or et l'argent constituent des solutions solides sans lacune de miscibilité. Le point de fusion de l'or est de 1 063 °C: l'or étant relativement aisé à obtenir pur, cette valeur est utilisée comme point de contrôle thermométrique international. L'or est un excellent conducteur électrique. C'est le plus malléable et le plus ductile de tous les métaux, propriété qu'explique une structure dans laquelle les plans de glissement sont particulièrement nombreux. Les possibilités mécaniques exceptionnelles de l'or justifient son emploi sous forme de feuilles très minces ou de filaments de faible section. Un gramme d'or peut être étiré en un fil de plusieurs kilomètres.

Tableau 5 : L'or.

Couleur :	Jaune
Symbole chimique :	Au
Numéro atomique:	79
Masse atomique:	196,967
Point de fusion:	1063°C
Point d'ébullition:	2970°C
Densité (à 20 °C):	19,3
Système cristallin :	CFC
Rayon atomique :	0,146 nm
E° Au/AuCl ₄	1 V

2.2.1.4.2 Propriétés chimiques

De tous les métaux, l'or est le moins électropositif; c'est là une conséquence de la stabilité de l'électron $6s^1$ qui, comme nous l'avons vu, est fortement lié au noyau. Il en résulte une faible réactivité chimique, l'or ne réagissant qu'avec des systèmes relativement oxydants ou lorsque la présence de ligands fortement donneurs permet la formation de complexes peu dissociés. Cette propriété explique d'ailleurs que l'or ne se rencontre pas sous forme de composés ioniques, la liaison étant toujours covalente. L'or a une excellente résistance à la corrosion.

2.2.1.4.3 L'or dans un alliage.

Lorsque la teneur d'or dans un alliage est supérieure ou égale à 60% en poids, l'alliage possède les mêmes propriétés que le métal [7]. Pour Brugirard [14], une teneur de 30% d'or est un minimum à maintenir. La taille des grains de l'alliage s'accroît de façon linéaire avec la proportion d'or dans l'alliage.

2.2.1.5 Les métaux d'addition

2.2.1.5.1 L'étain

De couleur blanche, sa densité est de 7,2 , sa température de fusion de 232°C. Dans un alliage, l'étain est présent jusqu'à 10% en poids, et permet un durcissement de la matrice cubique face centrée car il présente un rayon métallique nettement supérieur à ceux de l'or ou du palladium. Il abaisse la température de fusion de l'alliage. Les oxydes d'étain (SnO₂) participent à la liaison métal-céramique en diffusant jusqu'à 50 µm au sein de l'opaque. L'étain a une grande affinité pour l'oxygène. Il permet d'accorder l'alliage en dilatation avec la porcelaine. Il présente une grande affinité pour le cuivre, l'indium, le palladium, ce qui peut amener à la formation de mélanges biphasés ou de composés intermétalliques. Dans les alliages à haute teneur en palladium, l'étain possèdent la faculté de dissoudre une grande quantité d'oxygène, ce qui peut entraîner la formation d'oxydes d'étain en profondeur (de 50 à 100 µm) [7].

Tableau 6 : L'étain.

Couleur :	Blanc
Symbole chimique :	Sn
Numéro atomique:	50
Masse atomique:	118,69
Point de fusion:	232°C
Point d'ébullition:	2270°C
Densité (à 20 °C):	7,3
Système cristallin :	Tétraгонаle
Rayon atomique :	0,162 nm
E° Sn/Sn ²⁺ :	-0,15 V

2.2.1.5.2 L'indium.

Elément chimique du groupe des métaux rares, blanc argenté brillant, mou, plastique, rayable à l'ongle et très facilement déformable, découvert par Reich et Richter (1863) par ses deux raies dans le violet. Comme l'étain, courbé il pousse un «cri». Aussi rare que l'argent, l'indium accompagne dans la nature le zinc et le plomb dont il constitue un sous-produit des processus métallurgiques.

Tableau 7 : L'indium.

Couleur :	Blanc grisâtre
Symbole chimique :	In.
Numéro atomique:	49.
Masse atomique:	114,82.
Point de fusion:	156,2 °C.
Point d'ébullition:	2 080 °C.
Densité (à 20 °C):	7,31.
Système cristallin :	Tétraгонаle
Rayon atomique :	0,166 nm
E° In/In ²⁺ :	-0,14 V

L'indium se combine à chaud avec les halogènes et le soufre, mais peu de composés ont été préparés; dans ces combinaisons, le métal est monovalent. La plupart des composés trivalents possèdent des propriétés semi-conductrices. Le métal possède la propriété unique de permettre la réalisation des scelllements hermétiques verre/verre ou verre/métal, ainsi que des scelllements à partir du quartz, de la porcelaine et du marbre. Résistant dans l'air à la température ordinaire, il brûle, après chauffage au rouge, avec une flamme bleu violet en donnant de l'oxyde In₂O₃; il se dissout dans les acides minéraux, mais il n'est pas attaqué par les bases, ni par l'eau. c'est un métal doux, peu onéreux, qui ne se terni pas [30].

Dans un alliage, l'indium abaisse la température de fusion. Par exemple, l'introduction de 8% d'indium en poids dans un alliage Au(53%)-Pd(38%), abaisse le solidus de 285°C.

Ce métal est nécessaire à la liaison avec la céramique, en formant des oxydes stables à la température de cuisson de la céramique, et qui diffusent dans celle-ci. L'indium permet

d'ajuster, en l'augmentant, le coefficient de dilatation thermique de l'armature à celui de la céramique. La dureté est également augmentée.

L'indium est plus soluble dans l'or que le palladium, il remplace le zinc qui se vaporise à température élevée, et comme l'étain, il durcit la matrice cubique face centrée. A des concentrations élevées, l'indium supprime la passivité procurée par le palladium [7].

2.2.1.5.3 Les autres métaux d'addition.

Dans un alliage, le gallium est principalement ajouté pour compenser la diminution du coefficient de dilatation thermique qui résulte de l'élaboration d'alliages céramo-métalliques sans argent. Nous le retrouvons jusqu'à 10% en poids dans les alliages palladiés. Le Gallium s'oxyde facilement au sein de l'alliage mais provoque une diminution de la liaison métal-céramique [7]. Il est également utilisé pour abaisser la température de fusion des alliages. Le gallium est de couleur blanche, son symbole atomique est Ga, de densité 5,9, sa température de fusion est de 30,8°C.

Le cobalt est également additionné aux alliages à base de palladium. De couleur blanc rougeâtre, de densité 8,8, le cobalt est dur et cassant. Sa température de fusion est de 1490°C. Dans un alliage, le cobalt améliore les propriétés mécaniques, il augmente le module d'élasticité, la dureté, et la résistance à la traction de l'alliage.

Les platinoïdes réduisent la taille des grains par une fine précipitation hétérogène. C'est leur température de fusion élevée qui leur confère la qualité de germes hétérogènes, ce sont des éléments comme l'iridium (Ir, 2450°C), le Ruthénium (Ru, 2310°C) ou le rhodium (Rh, 1970°C). Ces trois éléments ont une excellente résistance à la corrosion.

Des éléments non précieux sont également utilisés en faible proportion (moins de 2% w/w). Ce sont des éléments comme le tantale (Ta), le Rénium (Re), le germanium (Ge) et le fer (Fe) [7].

2.2.2 Diagrammes binaires et ternaires (Pd-Cu-Ag-Au)

Les alliages semi-précieux destinés aux liaisons céramo-métalliques doivent posséder de bonnes propriétés structurales intrinsèques et permettre la formation d'une liaison « métal-céramique ». Actuellement ce sont les alliages à base de Pd qui sont de plus en plus utilisés pour cette application. Les industriels additionnent généralement au Pd du cuivre de l'argent ou de l'or. L'étain ou l'indium sont également présents en faible proportion pour permettre la formation de la liaison « métal-céramique ». Pour améliorer le durcissement grâce à des traitements thermiques, le mécanisme de transformation structurale est pour ces alliages du type désordre \rightarrow ordre, par l'apparition de composés définis comme Au-Cu ou Pd-Cu.

Cependant l'apparition de ces composés n'est pas un facteur favorable en ce qui concerne la résistance à la corrosion de ces alliages. Les diagrammes binaires entre ces différents éléments nous permettent d'apprécier le risque et la possibilité de formation de ces composés définis. Ainsi nous constatons (Figure 4) que les alliages E1 et E5 à base d'Ag et de Pd ne posséderont pas de composés définis, Ag et Pd formant une solution solide. Par contre (Figure 5) les alliages E2 et E9 (base Pd et Cu) sont susceptibles de former la phase Cu-Pd en faible proportion, E9 étant plus enclin à cette formation que E2.

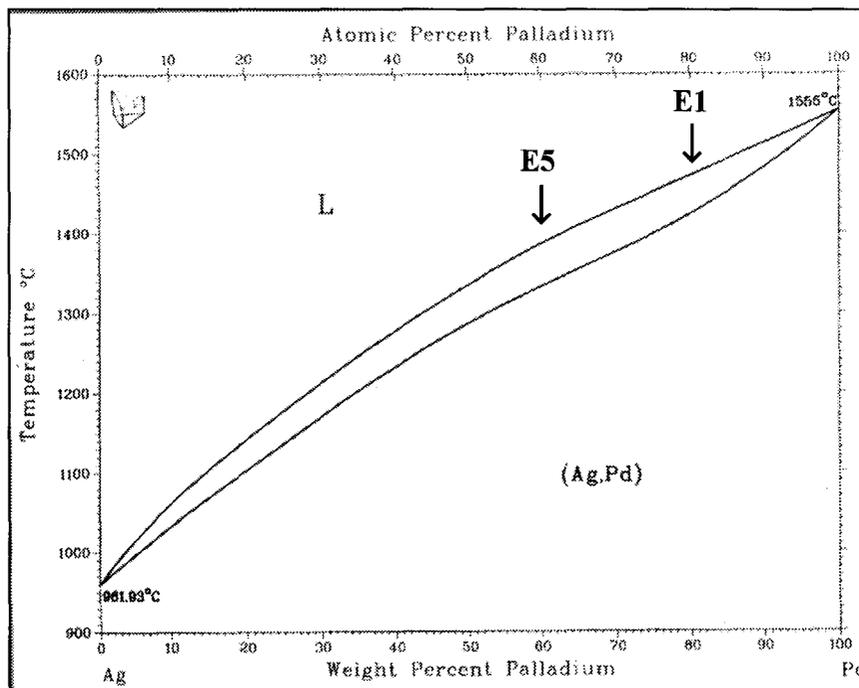


Figure 4 : Diagramme binaire Ag-Pd.

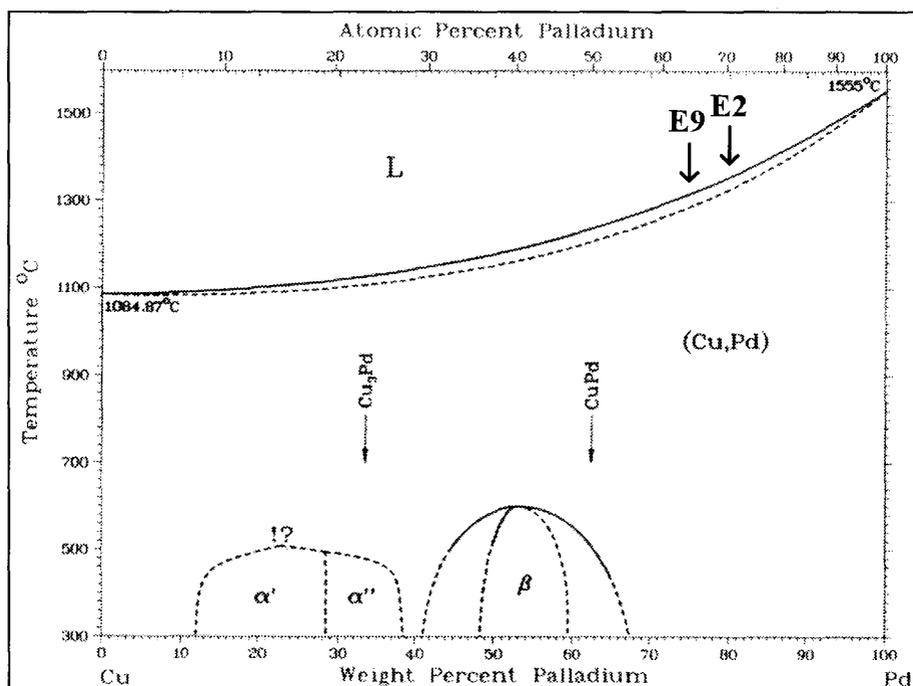


Figure 5 : Diagramme binaire Cu-Pd.

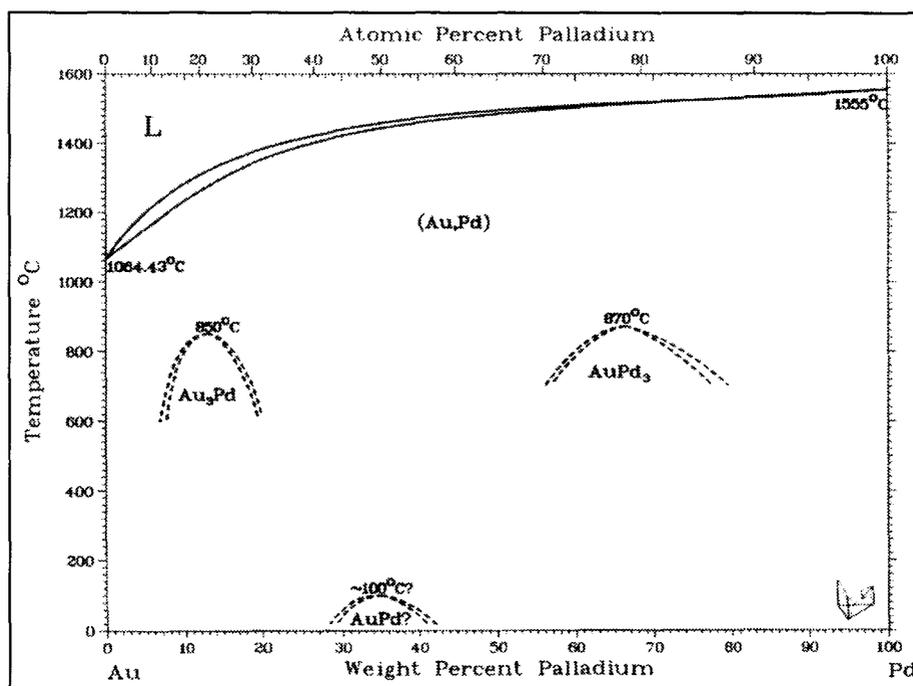


Figure 6 : Diagramme binaire Au-Pd.

Nous constatons également sur le diagramme Au-Pd (Figure 6) la présence de zones de démixtion à l'état solide autour de composés définis : Au_3Pd , AuPd , et AuPd_3 .

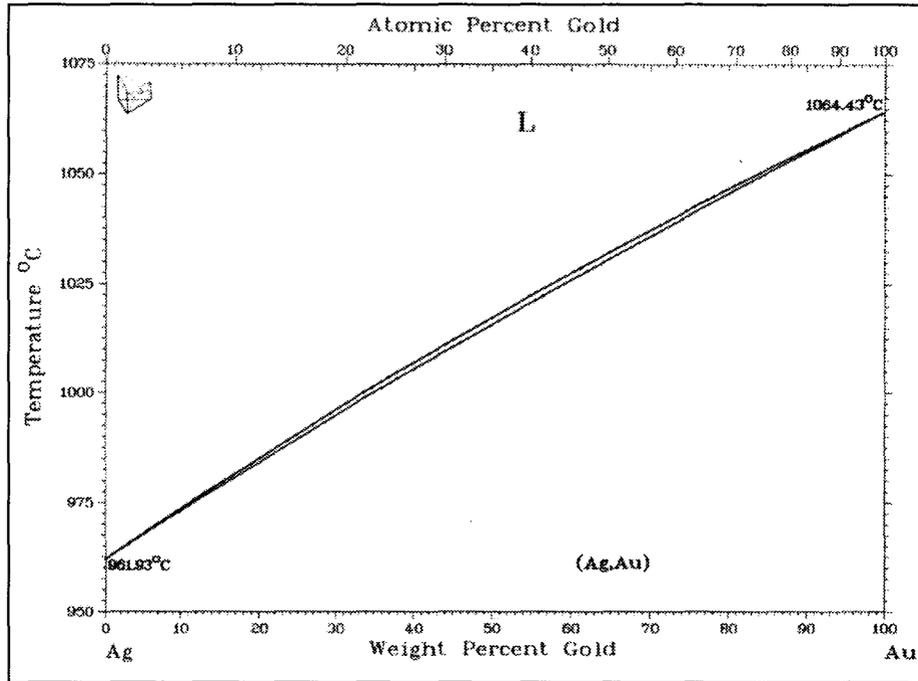


Figure 7 : Diagramme binaire Ag-Au.

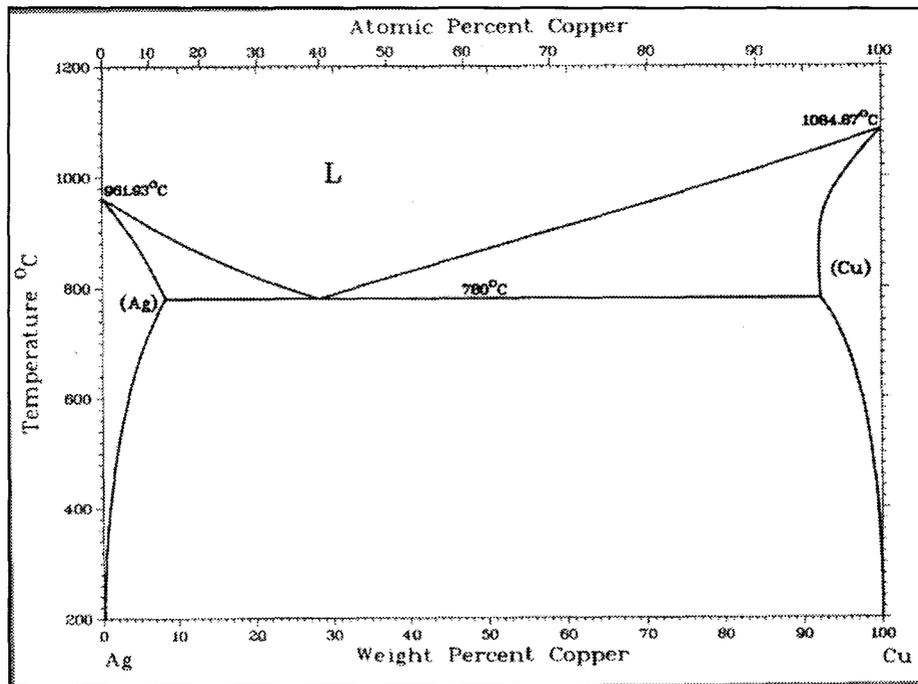


Figure 8 : Diagramme binaire Ag-Cu.

Nous constatons (Figure 7) que les alliages Ag-Au forment une solution solide alors que (Figure 8) les alliages Ag-Cu peuvent aboutir à des phases Ag ou Cu.

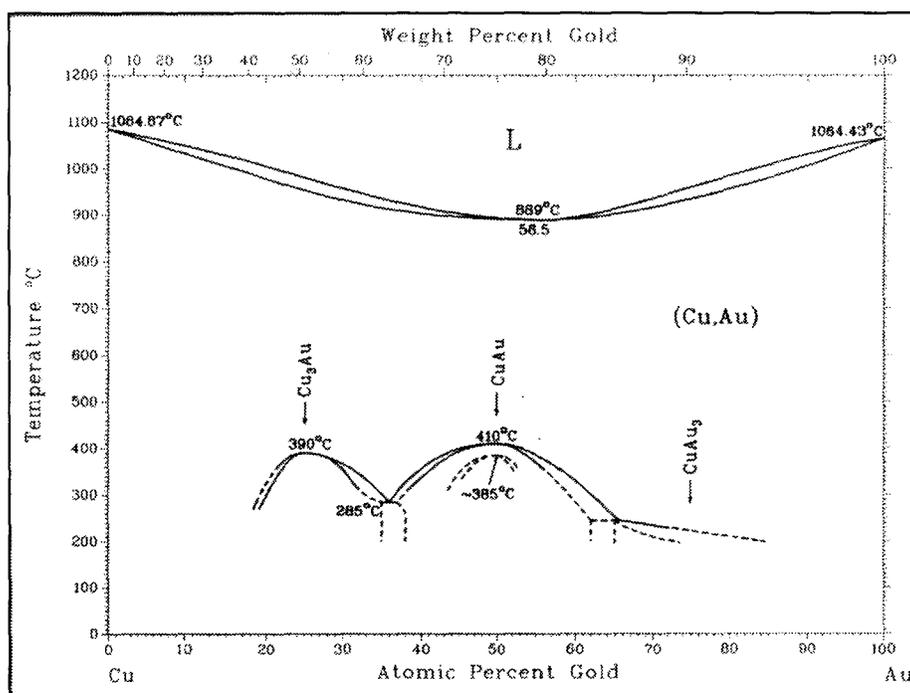


Figure 9 : Diagramme binaire Au-Cu.

Enfin nous constatons que l'or et le cuivre sont totalement miscibles à haute température (Figure 9), alors qu'à une température moyenne de 400°C il y a apparition de zones de démixtion avec la présence de composés définis comme Au_3Cu , AuCu , AuCu_3 .

Le solidus marque le début de la liquéfaction de l'alliage, le liquidus, la liquéfaction complète. La température du solidus est importante à considérer par rapport à la température de cuisson de la céramique. Le solidus doit se situer idéalement à 200°C au-dessus. Un écart trop faible soumet l'armature métallique à des contraintes à haute température qui se poursuivent lors du refroidissement : il s'agit du fluage. La température du solidus est à considérer aussi par rapport aux températures de brasage. L'adjonction de palladium a permis une élévation des températures du solidus et du liquidus par rapport aux alliages auro-céramiques à haute teneur en or [7].

Les composés définis susceptibles d'être rencontrés dans les alliages Pd-Cu-Ag-Au sont donc :

PdCu	Pd ₃ Au	Cu ₃ Au
PdCu ₃	PdAu	CuAu
	PdAu ₃	Cu ₃ Au

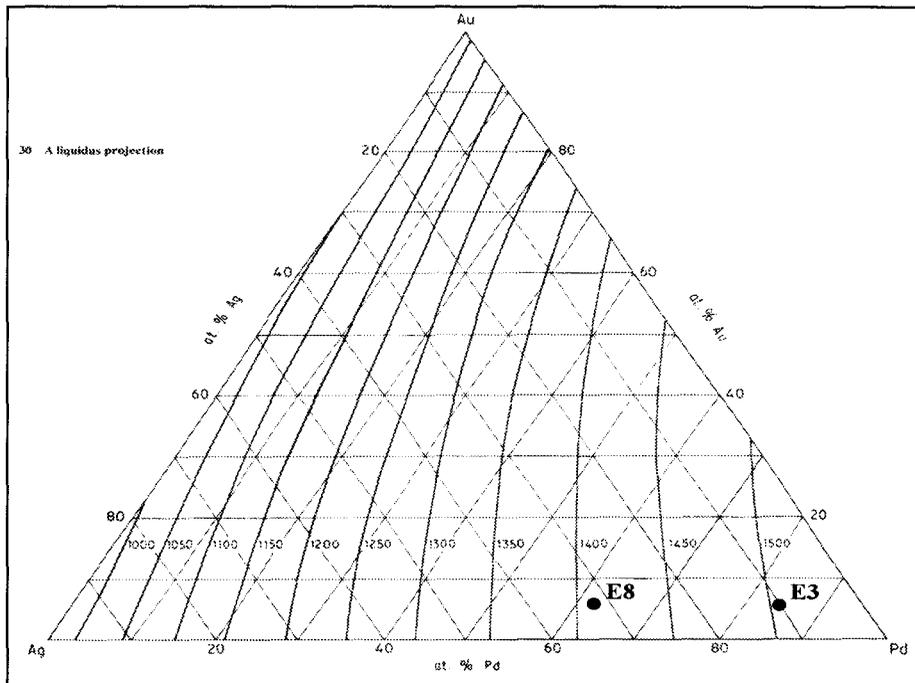


Figure 10 : Diagramme ternaire du liquidus Ag-Au-Pd (at.%) [76].

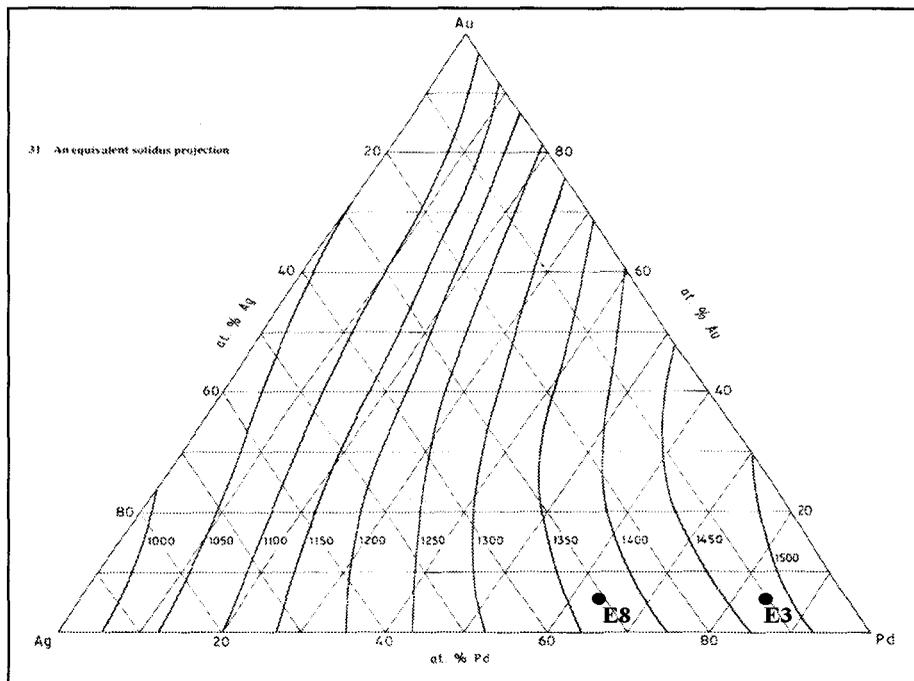


Figure 11 : Diagramme ternaire du solidus Ag-Au-Pd (at.%) [76].

Pour les diagrammes Ag-Au-Pd (Figure 10, Figure 11) les trois éléments sont totalement solubles à l'état liquide et jusqu'à une température de 900°C. Les deux diagrammes présentés montrent l'équilibre présent entre le liquide et le solide. Mais l'effet d'une addition d'argent aux composés tels que Au_3Pd et $AuPd$ n'a pas été étudié.

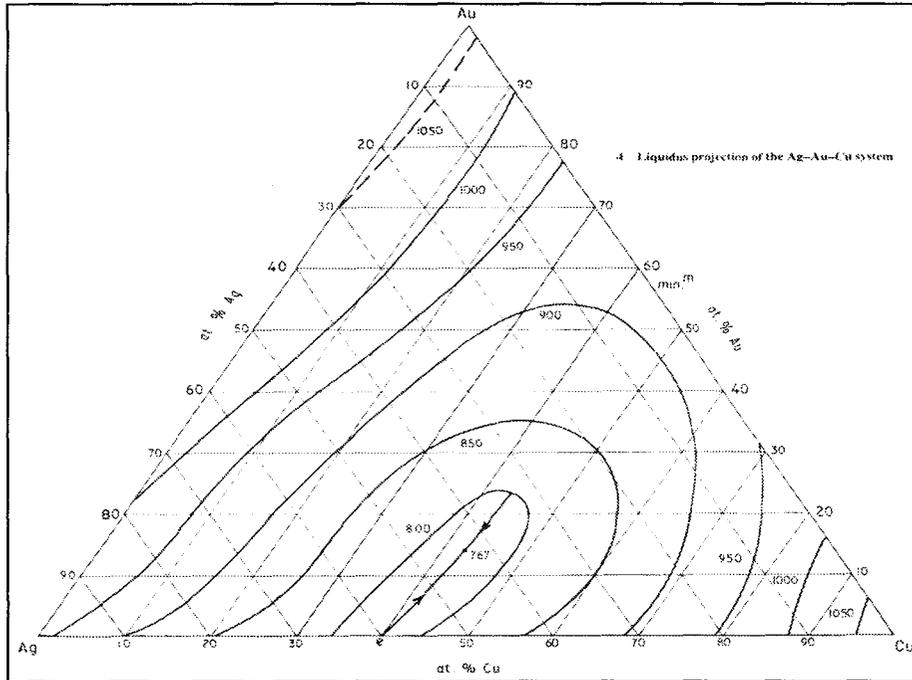


Figure 12 : Diagramme ternaire Au-Ag-Cu liquidus (at.%) [76].

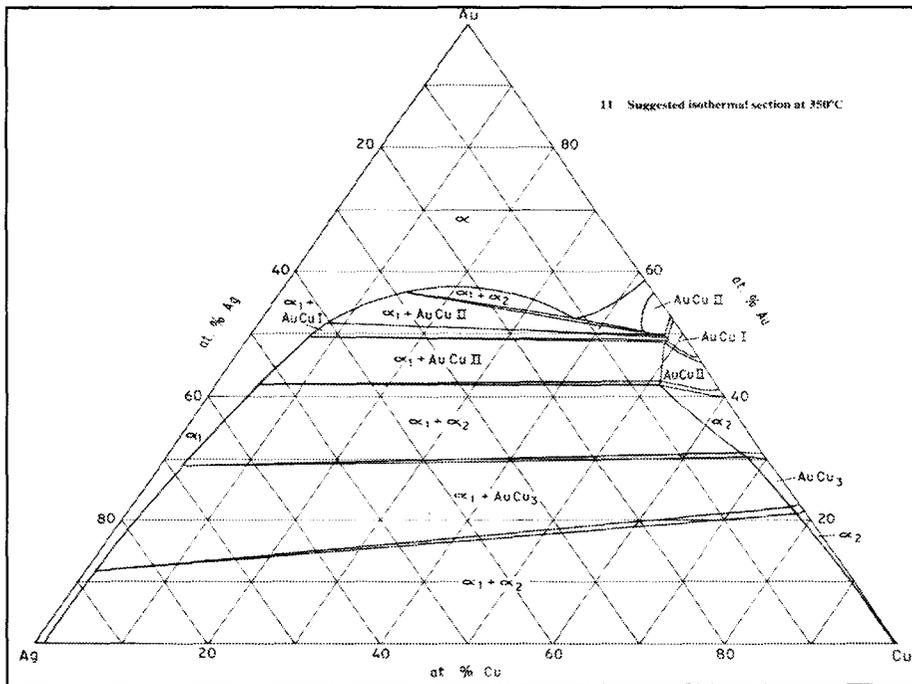


Figure 13 : Diagramme ternaire Au-Ag-Cu 350 °C (at.%) [76].

Nous constatons (Figure 12) que l'or tend à favoriser la réaction d'eutexie AgCu. Elle s'étend largement dans le diagramme ternaire. Nous remarquons (Figure 13) que l'argent a un rôle mineur sur la formation de la structure ordonnée AuCu. Les différentes phases à base de Cu et Au s'étendent largement dans le diagramme en direction de l'argent.

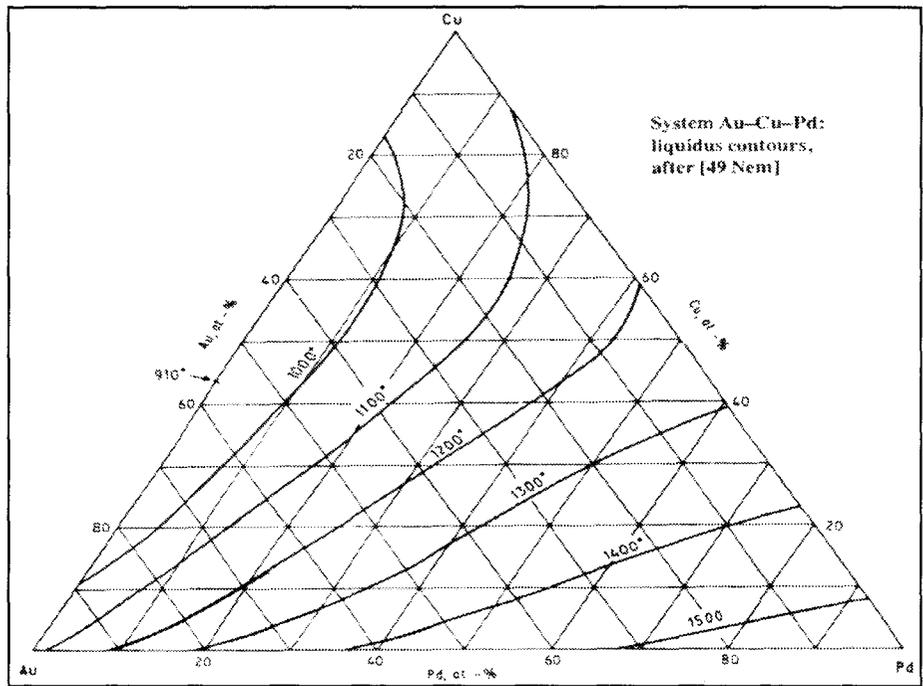


Figure 14 : Diagramme ternaire Au-Cu-Pd liquidus (at.%) [76].

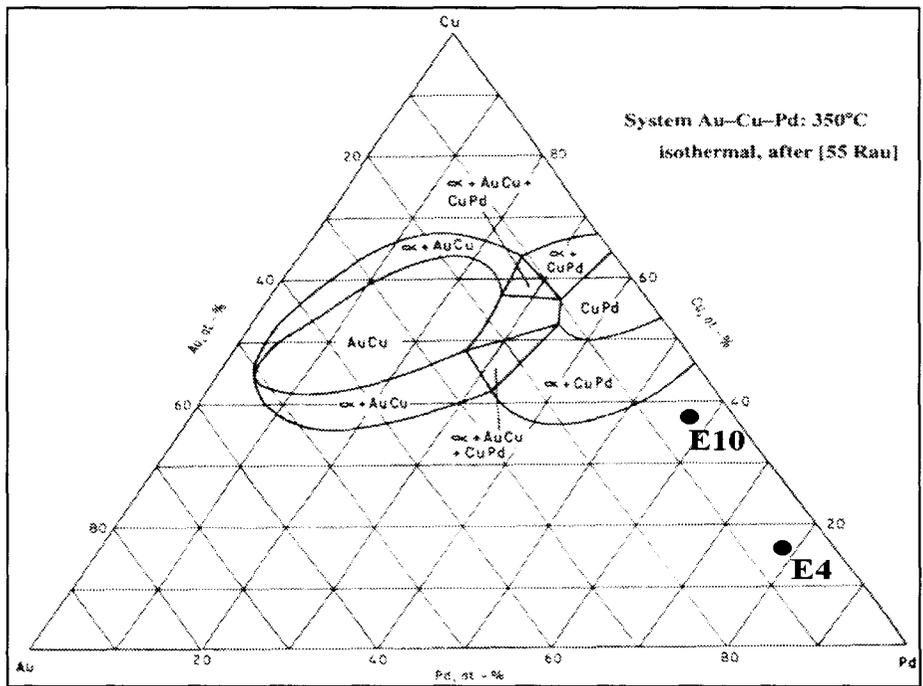


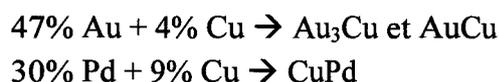
Figure 15 : Diagramme ternaire Au-Cu-Pd 350 °C (at.%) [76].

D'après les diagrammes ternaires Au-Cu-Pd [76] nous remarquons que la présence de palladium favorise la stabilité de la phase ordonnée AuCu. En effet sur le diagramme isotherme à 550°C nous pouvons constater l'existence attendue de la phase CuPd et la présence de la phase AuCu alors que la limite d'existence de cette phase dans le diagramme binaire Au-Cu n'est que de 410°C. Les domaines d'existence de ces phases s'étendent largement vers 450°C puis s'atténuent légèrement vers 350°C (Figure 15). De plus, l'or semble augmenter le domaine de stabilité de la structure CuPd. Notons la composition de E10 proche de la phase CuPd.

Tableau 8 : Récapitulatif des travaux antérieurs concernant les transformations structurales rencontrées dans les alliages précieux et semi-précieux [20].

Compositions pondérales des alliages étudiés	Transformations structurales rencontrées à basses températures				
	300°C	400°C	500°C	600°C	700°C
K.YASUDA 1978 66% Au-12% Ag-22% Cu	AuCuI + AuCuII	AuCuII + $\alpha_1 + \alpha_2$ (sol sol désordonnée)	α_1 + α_2	α désordonnée	
K.KANZAWA 1975 75% Au - 9% Ag - 16% Cu	AuCuI	α désordonnée			
M. OTHA 1980 5 à 20% Au – 54% Ag –25 à 30 % Pd 9 à 13% Cu	CuPd			α désordonnée	
M. OTHA 1979 10% Au–52% Ag–25% Pd–13% Cu	Formation de zones GP (phase β'')	PdCu+ α_2 (sol. désordonnée)		α désordonnée	
K.YASUDA 1986 47% Au, 45% Ag, 4% Pd, 4% Cu	AuCuI + Au ₃ Cu	Au ₃ Cu	α désordonnée		
K.UDOH 1986 76% Au, 4% Ag, 6% Pd, 14% Cu	Au ₃ Cu + AuCuI + α' (sol. solide désordonnée)	Au ₃ Cu + α'' (sol. solide désordonnée)	α désordonnée		
K.HISATSUNE 1982 30% Au-29% Ag-22% Pd-18% Cu- 1% Zn (% poids)	AuCu' (dans la matrice)+ AuCuI + α_1 + CuPd (aux joints de grains)		AuCu'+ α' (dans la matrice) α_1 + AuCuI+CuPd (aux joints de grains)	$\alpha_1 + \alpha_2$ +CuPd	
K.HISATSUNE 1990 55% Au, 20% Ag, 17% Cu, 3% Pd, 1% Pt-4% Zn	α_1 (sol désordonnée)+ α_2 (sol désordonnée)+ AuCuI			α désordonnée	
T.TANI 1991 68% Au-6% Ag-5% Pt-3% Pd- 15% Cu-3% Zn	AuCuI + α_2 (sol sol désordonnée)			α désordonnée	

Nous constatons (Tableau 8) que la présence de composés définis est extrêmement courante dans les alliages Pd-Cu-Ag-Au, malgré un très faible pourcentage de l'élément destiné à la formation du composé défini. Par exemple :



2.2.3 Microstructure

L'étude de la microstructure d'un alliage permet de mettre en évidence l'histoire de cet alliage lors de sa cristallisation et d'en déduire certaines de ses propriétés. Elle permet également de contrôler l'homogénéité en composition d'un cristal, ceci par l'absence ou la présence de dendrites. Ce paramètre nous permettra un classement des alliages en différentes catégories. Pour mieux appréhender ce paramètre de dendrites nous ferons un bref rappel concernant la cristallisation des métaux et l'apparition des dendrites.

Lors du refroidissement d'un alliage liquide, la cristallisation débute à l'échelle microscopique par la précipitation d'une phase primaire. Les cristaux correspondant peuvent croître librement et ne sont limités que par les plans cristallins qui mettent en évidence la symétrie du système.

Dans le cas du refroidissement rapide d'un métal pur, le métal passe par un état de surfusion. La naissance d'un germe et sa croissance dans un métal liquide en surfusion sont exothermiques, la chaleur de solidification se dégage à l'interface et n'est pas immédiatement évacuée. Le cristal croissant à une température plus élevée que le métal liquide, un plan de croissance uni est alors moins stable qu'une pointe faisant saillie dans le métal liquide en surfusion. En effet une pointe est caractérisée par une très grande surface relativement à sa masse. De ce fait, la surface de contact entre le cristal et le métal en surfusion devient importante et favorise l'évacuation de la chaleur de cristallisation. Quand une telle pointe apparaît, elle progresse facilement. La croissance débute donc dans une direction aléatoire mais suit préférentiellement une direction perpendiculaire à un plan cristallin d'énergie minimum (maximum de stabilité, empilement dense). Il s'ensuit une famille de direction principale pour la croissance du réseau cristallin considéré.

Un cristal peut arrêter sa croissance de façon temporaire ou définitive par une accumulation trop importante de chaleur localement due à sa propre cristallisation ou à la présence d'un cristal voisin en croissance libérant de la chaleur. A ce stade une seconde branche peut se former et croître perpendiculairement à la première : une branche fille vient de naître. L'opération peut alors se répéter sur la branche fille et engendrer une branche petite fille. La terminologie botanique employée pour la description du phénomène de croissance est choisie internationalement ; les cristaux sont appelés *dendrites* (dendron = arbre).

Au fur et à mesure que les cristaux croissent, leur limite se rapproche et leur développement s'en trouve gêné. Finalement ils se touchent avec le plus souvent une surface de séparation très irrégulière.

Pour un métal pur ou en l'absence de ségrégation cristalline, nous ne pouvons reconnaître la structure dendritique sur une surface polie. L'examen microscopique d'une surface polie et attaquée ne révèle en général rien d'autre que les limites de ces cristaux. En coupe ces limites sont appelées *jointes de grains*.

Puisque la solidification se termine aux joints de grains, il s'y produit nécessairement des défauts de l'empilement atomique. Ces régions défectueuses ont une énergie interne

considérable et si les conditions le permettent (T° , t) cet état se modifiera par polygonisation grâce à la diffusion. Les joints de grains seront également le site privilégié des attaques de l'environnement extérieur.

Lorsque le métal est un alliage, il est possible de voir apparaître des différences de concentration d'un certain élément dans une même phase en cours de solidification. Ce phénomène est appelé *ségrégation mineure*. En fait, le refroidissement est trop rapide pour que l'on puisse se considérer dans les conditions d'équilibre entre la solution solide et la solution liquide. Il n'y a donc pas homogénéisation parfaite par diffusion et la composition de la solution solide reste hétérogène. Considérons maintenant la formation des dendrites dans ces conditions. La diffusion étant imparfaite, dans une solution solide les premiers cristaux précipitent à une composition riche en élément de haut point de fusion (A), tandis que se déposent à une température plus basse des éléments d'une composition différente, moins riche en (A). Ainsi lorsque les cristaux primaires se développent librement sous forme de dendrites au sein du liquide, il est clair que la région axiale est plus riche en (A) et que l'autre constituant se concentre dans les couches externes des dendrites et surtout dans les régions interdendritiques solidifiées les dernières. Malgré une certaine diffusion, il subsiste toujours un gradient de concentration que l'on peut souvent mettre en évidence par des essais métallographiques. Dans notre étude la *ségrégation mineure* au niveau des dendrites sera mise en évidence par une attaque chimique.

Notons que si la diffusion est incomplète, la fin de la solidification est reportée vers des températures plus basses, de sorte que dans le cas des alliages complexes des impuretés désormais concentrées peuvent causer l'apparition d'une ou plusieurs phases supplémentaires disposées entre les dendrites. Ainsi contrairement au diagramme indiquant une solution solide, la structure même de l'alliage devient hétérogène.

Au niveau macroscopique, la cristallisation du métal s'effectue dans une lingotière de 15 mm de diamètre sur 140 mm de hauteur. Dans ce cas, nous pouvons admettre que le gradient de température à mi-hauteur est dirigé horizontalement et radialement. Considérons maintenant le métal liquide depuis la paroi de la lingotière jusqu'au centre (Figure 16). Immédiatement après la coulée dans la lingotière froide, une couche de métal se solidifie contre la paroi (Figure 16-1). La grande différence de température entre la lingotière et le métal liquide induit une surfusion importante du métal, et donc

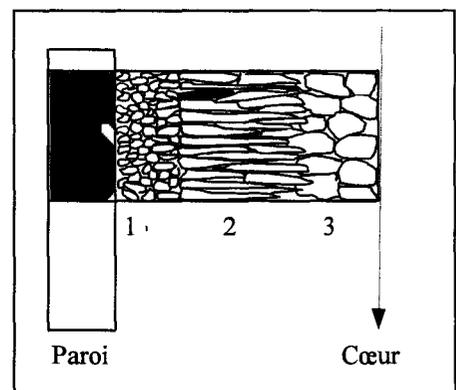


Figure 16 : La cristallisation dans un lingot.

par conséquent un grand nombre de germes stables (germination spontanée). Il se forme alors sur le pourtour de la lingotière une zone à cristaux nombreux, petits et non orientés.

Au fur et à mesure qu'augmente l'épaisseur de la couche solidifiée, le gradient de température diminue et la surfusion du front de cristallisation diminue fortement. La baisse de surfusion provoque un ralentissement de la vitesse de germination. Cependant le gradient de température étant encore très intense, la cristallisation devient basaltique (Figure 16-2). Cela signifie que les cristaux en croissance sont moins nombreux et que leur front de cristallisation

se propage plus longtemps vers le centre de la lingotière plus chaude. Nous obtenons donc des cristaux allongés et orientés vers le cœur.

Une troisième étape peut succéder à la zone basaltique. Il apparaît alors une zone centrale non orientée (Figure 16-3). Suite à une mauvaise évacuation de la chaleur vers l'extérieur, la température du métal s'homogénéise, la cristallisation basaltique cesse avec l'atténuation du gradient de température. Nous avons alors une solidification très lente, non dirigée, pratiquement sans surfusion. Ce sont précisément les conditions d'une cristallisation grossière sans orientation préférentielle.

Dans le cas de notre étude le diamètre de la lingotière étant assez faible, cette troisième phase n'est pratiquement pas présente et la zone basaltique s'étend pratiquement jusqu'au cœur du lingot. Nous voyons donc apparaître une hétérogénéité au niveau macroscopique, ce niveau de ségrégation est nommé *ségrégation majeure* en relation avec la *ségrégation mineure* qui a lieu à l'échelle du cristal primaire.

Les alliages à base de palladium que nous étudions seront utilisés comme alliages métallo-céramiques. Ces alliages subiront donc des cycles de cuisson lors de l'accroche de la céramique. La structure cristalline d'un alliage peut être modifiée après sa cristallisation par une élévation de la température, c'est le phénomène de recristallisation.

Cependant, les cycles de cuisson que subissent les alliages ne dépassent pas 1000°C avec des variations entre 30 et 980°C sur une période inférieure à 1 heure. Les températures sont donc bien inférieures au solidus des alliages. D'autre part, les alliages ne présentent pas de transformation allotropique, ils n'ont pas été écrouis et n'ont subi aucune déformation à chaud. L'alliage mis en bouche correspond donc à un alliage brut de coulée. C'est sous cette forme brute de coulée que se basera notre étude.

2.2.4 La liaison céramique.

La liaison métal-céramique est due à la rugosité de surface de l'armature, aux forces de Van Der Waals et à la liaison chimique (formation d'oxydes en surface et diffusion dans la céramique à partir de l'interface). L'un des facteurs influençant cette liaison céramométallique est le coefficient d'expansion thermique des alliages. Une parfaite adaptation des courbes d'expansion, et surtout de contraintes lors du refroidissement, doit être obtenue si nous voulons éviter des tensions à l'interface céramique/métal pouvant conduire à des fractures.

L'expansion des alliages or/palladium est faible à cause de l'absence d'argent. Le palladium diminue le coefficient de dilatation thermique de l'alliage. Celui-ci est compensé par la présence d'indium et d'étain qui le réajustent à la hausse [7].

Les essais de traction montrent en moyenne que les alliages palladiés présentent une force d'arrachement supérieure de 25% environ par rapport aux alliages or/céramiques classiques [7].

L'instabilité des oxydes de palladium et d'argent à haute température fait que ces éléments ne participent pas à la liaison métal-céramique. Ce rôle est joué par les oxydes d'étain et d'indium.

2.2.5 La corrosion

2.2.5.1 Définition générale de la corrosion et différents types de corrosion.

Il existe trois types de corrosion : la corrosion chimique, la corrosion électrochimique et la corrosion bactérienne qui est une forme de corrosion électrochimique. La corrosion est l'action destructive des matériaux sous l'effet d'une réaction chimique ou électrochimique avec un milieu ambiant agressif [36]. Les métaux et alliages utilisés par l'homme ne se retrouvent pas sous cette forme dans la nature. Il faut dépenser de l'énergie pour les élaborer et il est donc naturel qu'ils tendent à retourner à leur état originel qui est un état oxydé plus stable. Cette tendance des métaux à retourner à leur forme d'oxydes métalliques est d'autant plus forte que l'énergie nécessaire pour extraire le métal du minerai a été importante. Le palladium, l'or, le platine se trouvent à l'état naturel dans le sol, c'est-à-dire à l'état métallique pur et directement utilisable après simple fusion. C'est pour cette raison qu'ils sont qualifiés de nobles.

La corrosion dans un métal ou dans un alliage peut se développer selon différents processus qui caractérisent chacun un type de corrosion :

- la corrosion chimique
- la corrosion électrochimique
- la corrosion bactérienne

2.2.5.1.1 La corrosion chimique

La corrosion chimique est une réaction hétérogène entre le solide métallique et :

- une phase gazeuse : La corrosion sèche désigne alors la corrosion dans les gaz CO₂, SO₂, CO, H₂O vapeur, Cl₂ à haute température.

- ou liquide : L'attaque d'un métal par un autre métal liquide (Hg par exemple), par un sel fondu ou par un liquide organique peut être considéré comme une corrosion chimique.

2.2.5.1.2 Corrosion électrochimique.

La corrosion purement chimique ne fait pas intervenir le passage d'un courant électrique. La corrosion électrochimique caractérise plus particulièrement la corrosion des métaux au contact d'une solution aqueuse contenant un électrolyte dissous et de ce fait conducteur de l'électricité. Des électrons libres prennent part au processus de cette corrosion humide avec laquelle nous sommes le plus souvent confrontés.

2.2.5.1.3 La corrosion bactérienne.

Les micro-organismes (bactéries et champignons) peuvent intervenir dans le processus électrochimique de la corrosion métallique de diverses façons. Cela n'est pas surprenant car les colonies de micro-organismes peuvent altérer radicalement l'environnement au voisinage immédiat d'un implant, notamment dans la cavité buccale où la flore bactérienne est très diversifiée [89].

Les variables les plus importantes influençant la vitesse de corrosion sont le pH de la solution et le degré d'aération. Dans certaines conditions, des micro-organismes sont capables de modifier ces paramètres, en libérant des produits métalliques acides ou en consommant de l'oxygène. Il est donc probable que les sites infectés autour des implants influencent la stabilité électrochimique par :

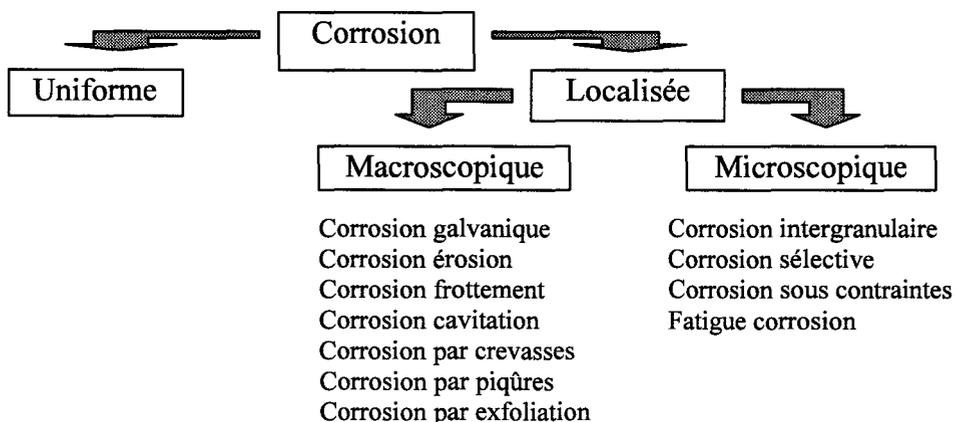
- Une attaque chimique : libération par les micro-organismes de produits métalliques très corrosifs entraînant une destruction des couches protectrices.
- La formation d'un voile bactérien provoquant une différence d'aération entre les parties recouvertes et non recouvertes.
- Une action dépolarisante sur l'anode ou sur la cathode. C'est le cas par exemple, des bactéries sulfato-réductrices qui mobilisent l'hydrogène produit par la corrosion à la cathode pour réduire les sulfates : $SO_4^{2-} + 8 H \rightarrow S^{2-} + 4 H_2O$, l'hydrogène à la surface du métal induisant une dépolarisation cathodique. Cette dépolarisation permet à la corrosion de se poursuivre.

2.2.5.2 Principales formes de corrosion

Les conséquences de la corrosion peuvent se manifester sous différentes formes dont les plus visibles ne sont pas toujours les plus dangereuses pour la résistance mécanique du matériau. Il est commode de classer les types de corrosion d'après l'aspect que présente le métal corrodé à l'œil nu ; la corrosion peut se développer soit de façon uniforme, soit de façon localisée.

La corrosion uniforme ou généralisée se manifeste avec la même vitesse en tous les points du métal, selon le processus électrochimique (corrosion humide) ou chimique (corrosion sèche). La corrosion localisée n'affecte que certains points de la surface métallique. Une distinction doit être faite entre la corrosion localisée macroscopique identifiée par une simple observation visuelle et la corrosion microscopique pour laquelle des dégâts considérables se produisent avant que le phénomène soit visible à l'œil nu. Les différents types de corrosion peuvent être classés dans le tableau suivant (Tableau 9).

Tableau 9 : Les différentes formes de corrosion.



2.2.5.2.1 Corrosion généralisée ou uniforme

La corrosion généralisée se déroule sur l'ensemble de la surface du métal avec diminution régulière de l'épaisseur de celui-ci ou simplement avec changement de coloration (ternissement) . Il s'agit du mode de corrosion le plus important.

2.2.5.2.2 Corrosion localisée.

La corrosion localisée n'affecte que certains points de la surface métallique. Une distinction doit être faite entre la corrosion localisée macroscopique identifiée par simple observation visuelle et la corrosion localisée microscopique pour laquelle des dégâts considérables se produisent avant que le phénomène soit visible à l'œil nu.

2.2.5.2.2.1 Corrosion localisée macroscopique

La corrosion localisée macroscopique est une corrosion qui peut être décelée à l'œil nu.

2.2.5.2.2.1.1 Corrosion par piqûres

La corrosion par piqûres est une attaque très intense qui se produit en certains points de la surface du métal. Ce sont des zones qui étaient ou qui sont devenues anodiques pour diverses raisons. Cette corrosion se manifeste par des piqûres ou des crevasses à la surface du métal, entraînant sa fragilité, donc une diminution de sa résistance mécanique. Des contraintes mécaniques appliquées à ce niveau peuvent alors créer des fissures agissant comme amorce pour la rupture du métal. Ce type d'attaque est d'autant plus dangereux qu'il est difficile à détecter tout particulièrement dans le cas de piqûres. L'exemple le plus typique est celui des aciers inoxydables en présence d'ions chlorures. L'attaque se limite à des trous très localisés et pouvant progresser très vite en profondeur alors que le reste de la surface reste indemne.

2.2.5.2.2.1.2 Corrosion galvanique ou bimétallisme

La corrosion galvanique se produit à chaque fois que deux (ou plusieurs) métaux de nature différente sont couplés et placés dans une même solution. Il s'établit entre eux une différence de potentiel. Dans ces conditions, le métal ayant le potentiel le plus électro-négatif deviendra l'anode et se corrodera, alors que le métal le plus électro-positif deviendra la cathode. La corrosion de l'anode est d'autant plus importante que la surface est plus réduite par rapport à la cathode.

2.2.5.2.2.1.3 Corrosion caverneuse

Ce type de corrosion se développe surtout en milieu stagnant, sous les dépôts adhérents de matière solide, dans les interstices de construction (contact entre dent et amalgames, entre plaques et vis d'ostéosynthèse), dans les fentes étroites (sous les boulons et les écrous), et d'une manière générale dans tous les espaces confinés où le renouvellement de la solution par convection est rendu difficile par la géométrie locale. En effet, en raison du blocage de la diffusion de l'oxygène dans les crevasses, le voisinage immédiat du métal devient acide. Cette acidité augmente avec le temps, entraînant une accélération du processus de corrosion.

2.2.5.2.2.1.4 Corrosion sous frottement

Les produits de la corrosion sont souvent protecteurs et ralentissent la poursuite de l'attaque. Lorsqu'il y a frottement entre cette couche et une autre partie dure, l'abrasion qui en résulte entraîne l'arrachement de la couche de passivation en certains points. Sur ces points, la corrosion repart et est même accélérée à cause d'un rapport d'aires défavorable. Dans le domaine dentaire cette corrosion est liée aux frottements avec les aliments.

2.2.5.2.2.2 Corrosion localisée microscopique

2.2.5.2.2.2.1 Fissuration

Elle se manifeste lorsqu'un métal est soumis à la fois à des efforts mécaniques de traction et à un milieu corrosif. Cela provoque une fragilisation du métal. Il y a de nombreuses situations dans lesquelles les contraintes mécaniques peuvent s'allier au milieu corrosif en affectant le métal. Les fissurations se retrouvent par exemple aux différents points de contact d'une dent avec un amalgame.

2.2.5.2.2.2.2 Corrosion intergranulaire

La corrosion intergranulaire se caractérise par une plus grande sensibilité à la corrosion au niveau des joints de grains sous l'action du milieu corrosif. Le métal se corrode en profondeur suivant un trajet constitué par les joints de grains qui perdent ainsi leur cohésion. Ce type de corrosion intervient dans un milieu corrosif. En effet les joints de grains sont des zones où l'arrangement atomique est perturbé. De ce fait, ce sont des aires de grande énergie, ce qui entraîne une plus grande instabilité chimique. Par ailleurs, les impuretés qui cristallisent vers la fin de la solidification du métal, tendent à se rassembler aux joints de grains, y constituant des zones d'hétérogénéité.

Ce type de corrosion est particulièrement dangereux car, bien que la quantité de métal attaquée soit faible, les fissures ainsi produites altèrent considérablement les caractéristiques mécaniques du matériau avec un risque de rupture. Dans les cas les plus sévères, cette corrosion entraîne une désagrégation complète du métal sans perte de poids notable.

2.2.5.2.2.2.3 Corrosion sélective

Dans le cas d'un alliage monophasé, il s'agit de la dissolution préférentielle d'un élément de l'alliage, par exemple du zinc dans un laiton plongé en milieu HCl. Lorsque l'alliage est constitué de plusieurs phases, la corrosion sélective est caractérisée par la présence d'un élément plus corrodable que les autres. L'attaque ne continue à progresser au même endroit que s'il s'y trouve un nouveau grain du constituant sensible à la corrosion. Devenu poreux, l'alliage conserve souvent sa forme initiale et peut paraître intact mais sa résistance à la traction et particulièrement sa ductilité sont sérieusement réduites.

2.2.5.2.2.2.4 Corrosion sous contrainte

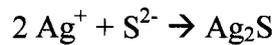
Lorsque l'effort appliqué est permanent, c'est la corrosion sous contrainte. La formation de fissures conduit à une rupture de type fragile qui se produit brutalement (acier inoxydable en milieu chloruré). Les contraintes peuvent être d'origine interne (laminage, emboutissage, soudure) ou d'origine externe (effort en cours d'utilisation).

2.2.5.2.2.2.5 Corrosion sous fatigue

Lorsque les efforts appliqués sont alternés ou répétés, c'est la corrosion sous fatigue. En l'absence de milieu corrosif, il est possible de définir une valeur limite d'endurance en fonction du nombre de cycles de l'effort. En dessous de cette valeur limite la rupture par fatigue ne se manifeste plus, même pour un nombre élevé de cycles. En présence d'un milieu corrosif, il n'est plus possible de connaître cette limite. Il est probable que la dissolution anodique et l'absorption d'hydrogène produites par la réaction cathodique jouent un rôle important dans ces mécanismes de corrosion sous contrainte et de corrosion sous fatigue.

2.2.5.3 Le ternissement.

Le ternissement est forme de corrosion qui se développe surtout dans les milieux non aqueux. En ce qui concerne les alliages palladiés, le ternissement touche essentiellement la famille des Pd-Ag. Dans un alliage, le palladium augmente la résistance au ternissement. Ce phénomène se produit en présence de composés à base de soufre, conformément à la réaction suivante.



Le ternissement constaté en milieu buccal peut également avoir lieu lors de la coulée, des traitements thermiques ou du brasage. Cependant le préjudice est plus esthétique que fonctionnel [7].

2.2.6 Electrogalvanisme buccal et sa pathologie

Les conditions favorables à la corrosion métallique en milieu buccal sont multiples [36]:

- L'utilisation en bouche de métaux sous forme d'alliage entraînent la formation d'une multitude de micropiles.
- coexistence dans une même cavité buccale de plusieurs reconstitutions métalliques réalisées avec différents matériaux.
- présence d'une aération différentielle par la présence d'un gradient de concentration en oxygène dans les interstices.
- présence d'un électrolyte dont le pH peut varier.

L'électrogalvanisme buccal constitue donc un facteur d'irritation chronique, surtout s'il est associé à une mauvaise hygiène dans les zones d'accès difficile et mal aérées. La formation de macro- et micropiles intrabuccales a pour conséquence l'apparition de microcourant et une corrosion des métaux. La pathologie découle essentiellement de ces deux facteurs. Les phénomènes électriques vont soumettre les organes nerveux à une irritation chronique, ce qui se traduit souvent par des manifestations réflexes et neurotrophiques. Les phénomènes corrosifs se soldent par une libération d'ions métalliques provoquant des lésions au niveau de la dent et des tissus environnants ainsi que sur l'organisme en général.

Souvent bénignes, les manifestations se traduisent par :

- des picotements,
- un goût métallique,
- des brûlures localisées,
- des irritations et des inflammations des tissus et des muqueuses voisines,
- une sécheresse buccale,
- une métallose (inclusion d'ions métalliques dans les tissus parodontaux).

Voire même par :

- des algies projetées,
- des nécroses osseuses et muqueuses,
- une dentinolyse et une ostéolyse,
- la fracture de racines.

2.2.6.1 Pathologie dentaire locale

La pathologie peut se révéler par la présence de chocs électriques pulpaire. En effet, la pulpe va réagir à une décharge électrique émise lors d'un contact entre deux alliages différents. Ce choc peut se transmettre par l'intermédiaire de la langue, des joues, des gencives. La douleur est très aiguë et peut durer quelques minutes à chaque fermeture de circuit. Elle peut être accompagnée d'un goût métallique. En absence de tout traitement, les douleurs peuvent au bout de quelques semaines s'atténuer naturellement.

2.2.6.2 Pathologie locorégionale

Il s'agit de toutes les inflammations que l'on peut observer dans la sphère buccale : érythème, érosion, ulcération, gingivite, stomatite, glossite, chéilite, perlèche, kératose. Il est également possible de retrouver des dysfonctionnements des glandes salivaires entraînant une hypersialie et une hypertrophie induite par l'action des micro-courants.

2.2.6.3 Pathologie générale

Tous ces phénomènes peuvent être isolés ou associés et se compliquer de manifestations à distance. Il n'est pas rare, en effet, de trouver chez un malade présentant des phénomènes d'électro galvanisme buccal, certains troubles qui affectent également son état général (anémie, crise d'asthme, céphalées, eczéma...).

2.3 CONCLUSION

Au vu des différents problèmes que provoquent les alliages dentaires mal adaptés il nous est apparu nécessaire d'évaluer la réponse biologique *in vitro* induite par une gamme de 36 alliages représentative de tous les alliages précieux commercialisés. Dans ce travail nous tenterons de mettre en relation la composition de ces alliages et leur réponse biologique *in vitro*.

Dans un deuxième temps nous nous intéresserons aux alliages base Pd-Cu-Ag-Au. Nous tenterons d'optimiser une composition afin que celle-ci apporte une réponse biologique optimale, ceci tout en respectant le cahier des charges imposé par l'entreprise. Cette optimisation se fera par l'intermédiaire d'un plan d'expériences pour maîtriser les différentes compositions. L'étude portera sur des mesures physico-chimiques comme la structure cristalline et la dureté des alliages, sur des mesures électrochimiques, et sur des évaluations biologiques *in vitro*.

Nous tenterons dès lors d'établir des relations entre ces différents paramètres et finalement de proposer une composition qui réponde au mieux aux différentes contraintes du cahier des charges en privilégiant la réponse biologique.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 MATERIAUX ETUDIES

Les matériaux employés pour cette étude sont biologiques (lignées cellulaires) et métalliques.

3.1.1 Type cellulaire utilisé

Une lignée de fibroblastes et une lignée de cellules épithéliales ont été utilisées pour cette étude.

3.1.1.1 Fibroblastes NIH 3T3

Cellules NIH3T3 : (ATCC-CRL 1658, cellules fibroblastiques embryonnaires de souris suisses NIH à inhibition de contact). Maintenues en survie par des repiquages réguliers dans le Milieu Eagles Modifié par Dulbecco (Gibco) supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau nouveau né décomplémenté (Eurobio).

3.1.1.2 Cellules épithéliales L132

Cellules L132 : (ATCC-CCL 5, cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain). Maintenues en survie par des repiquages réguliers dans le Milieu Eagles (MEM, no 2011, Eurobio) supplémenté avec 5% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF).

3.1.2 Alliages commerciaux

La gamme EC de la société ENGELHARD-CLAL a été testée au niveau biologique pour obtention du marquage CE. La composition massique (%) de ces alliages est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 10).

Tableau 10 : Composition massique (%)des alliages de la game EC

Ref. EC	Désignation	Au	Ag	Pt	Pd	Cu	Zn	Sn	In	Ga	Divers				
											Fe	Rh	Ir	Ru	Ti
alliages jaunes métallo.céramiques															
EC 910	DIAZERAM	854,5	10	80	25				25		5		0,5		
EC 920	DIAZERAM SF	851	5	100	20				20		2		2		
EC 930 BIO	ADORBOND P300	794	20	160			21						1	4	
EC 940 BIO	ADORBOND G	860		110					23		5	2			
EC 950	ADORBOND LF	695	105	95		40	30		30			5			
alliages blancs Or Palladium métallo.céramiques															
EC 710	ADORBOND S	780	10	95	90	5		6	12				2		
EC 720	CERAMZYL	590	30		300				80						
EC 730	CERAMZYL 51	512			386				86	15				1	
EC 740	PGX 45	451			449			30	50	20					
alliages blancs base Pd métallo.céramiques															
EC 510	ADORPALL 3	53	65		742			80	10	45				5	
EC 520	ACTAZERAM	20			785	100			10	80				5	
EC 530	PALZERAM		265		615			30	70	15				5	
EC 540	PG 80		60		795		10		60	70				5	
EC 550	ACTAZYL				820	50		50	15	55				10	
alliages jaunes à haute teneur en Or															
EC 820	INLAY MEDIUM	770	126		20	80	4								
EC 830	DENTOZAN M	730	150	22	28	65		4,8					0,2		
EC 850	INLAY EXTRA HARD	685	136	30	35	110	4								
EC 860 Bio	ADOR PF	709	130	35		120	5						1		
alliages jaunes à teneur en Or réduite															
EC 610	COLINOR 2	650	170	9,8	30	125	10	5					0,2		
EC 620	ENGELHARD 444	600	220		40	125	10		5						
EC 630	CLAFORZAN M	580	230	9,8	46	122	12						0,2		
EC 640	BAKER 455	550	240		50	145	10		5						
EC 650	BAKER 340	400	470		37	83	10								
EC 660 Bio	ADOR TIX	595	306	50			20		25			0,5	0,5	3	
alliages de métaux précieux blancs															
EC 410	DENTOZYL 4	225	405	75	220	60	10							5	
EC 420	DENTOZYL	100	545	100	220	20	10							5	
EC 430	FORZADEN M	30	555		300	100	15								
EC 450	PALLACAST ECO		410		400	170	20								
EC 460	EC 460	112	496	30	250	96	16								
alliages magnéto sensibles															
EC 210	MAGNET ECLA	200	100		600						100				
alliage spécial															
PV2	PV2	80	370	250	300										
Brasures															
GP 1040	CFZ	650	345						5						
GP 1115	PG2	840			100		60								
GS 700	CF4	725	100	5		29	120		20				1		
GS 830	CFWL	600	150			200				50					
		Au	Ag	Pt	Pd	Cu	Zn	Sn	In	Ga	Fe	Rh	Ir	Ru	Ti

3.1.3 Alliages expérimentaux Pd-Cu-Ag-Au

Les alliages commerciaux ont des compositions très variables. L'interprétation des résultats biologiques qu'ils engendrent et les corrélations possibles entre réponse biologique et la composition s'en trouvent d'autant plus difficiles.

De façon à mieux contrôler l'impact biologique que provoque un élément au sein d'un alliage, il est nécessaire de pouvoir maîtriser la composition de l'alliage. Notre étude s'intéressera plus particulièrement aux alliages Pd-Cu-Ag-Au. Nous tenterons d'expliquer sur le plan biologique l'impact que peut avoir un élément en fonction de sa teneur dans l'alliage et les relations que peuvent avoir les éléments entre eux. Pour se faire, le travail s'effectuera autour d'un alliage spécifique pour application métallo-céramique.

3.1.3.1 Cahier des charges

Pour des intérêts économiques et commerciaux, le travail se portera sur un alliage base palladium avec une teneur comprise entre 800 et 600 millièmes de Pd, de façon à obtenir un alliage métallo-céramique pouvant concurrencer les alliages base or.

On additionnera de l'Ag pour baisser le coût de l'alliage dans des proportions allant de 0 à 400 millièmes. Au delà de 400 millièmes certaines céramiques peuvent verdir. Nous ajoutons également du cuivre pour renforcer les propriétés mécaniques de l'alliage, addition de 0 à 250 millièmes de Cu. Le Pd s'oxyde lorsqu'il est chauffé et provoque un problème de coloration dans la céramique dû à l'apparition d'oxyde de Pd noirâtre. Une addition d'or permet de limiter cet effet et pour ne pas augmenter le coût de l'alliage, cette addition sera comprise entre 0 et 100 millièmes. Il faudra également rajouter quelques éléments d'addition comme l'étain ou l'indium pour permettre une meilleure accroche de la céramique à l'alliage.

Le cahier des charges se résume donc à des contraintes en composition (Figure 17) pour les différents éléments de l'alliage et à la présence en faible proportion de quelques éléments d'addition.

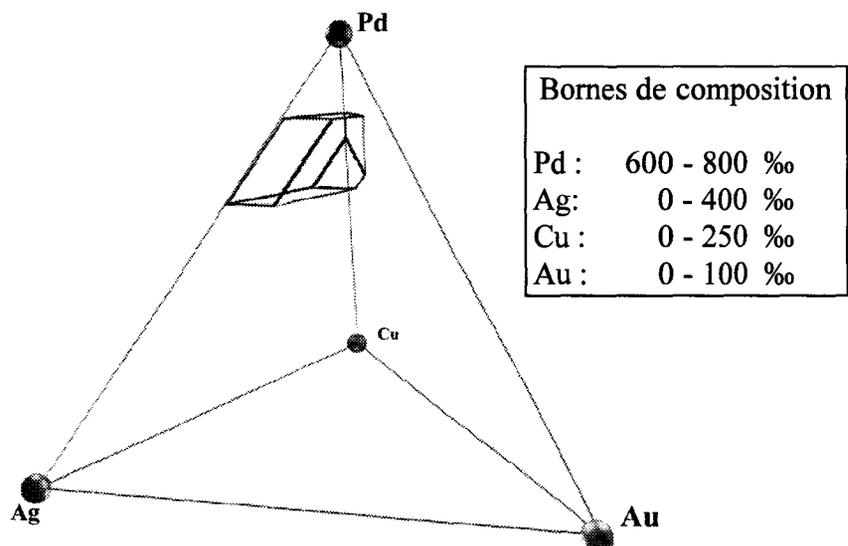


Figure 17 : Contraintes en composition imposées par le cahier des charges sur alliages Pd-Cu-Ag-Au.

3.1.3.2 Plan d'expériences

Les compositions d'alliages respectant les contraintes imposées par le cahier des charges étant innombrables, il s'est avéré nécessaire d'utiliser un plan d'expériences sous la forme d'un « plan-mélange » à 4 composants Pd-Cu-Ag-Au. Dans ces conditions les contraintes limitent la composition de l'alliage à un « polyèdre » à 10 sommets (Figure 18).

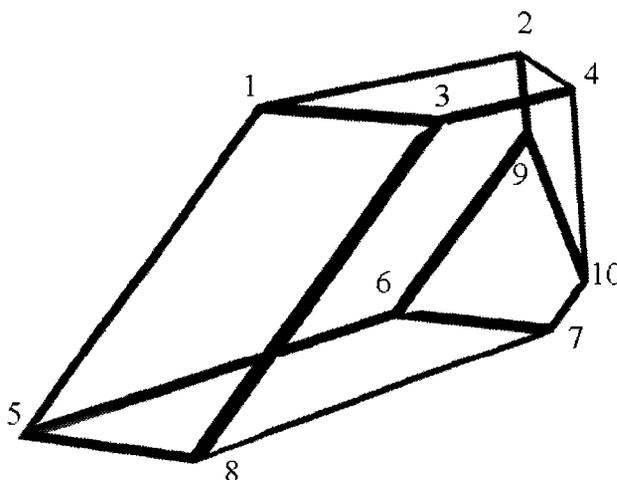


Figure 18 : Polyèdre de composition permise par le cahier des charges.

On choisira de couler la composition de chacun des sommets de façon à obtenir le domaine le plus étendu possible. Les alliages ainsi obtenus seront notés de E1 à E10. Nous réaliserons également la composition du centre de gravité du polyèdre qui sera noté « G » et une composition quelconque du domaine pour valider le plan d'expériences ; cet alliage sera noté « M ». La composition de ces différents alliages est récapitulée dans le tableau ci dessous (Tableau 11).

Tableau 11 : Composition retenue pour effectuer les essais biologiques.

<u>10 Compositions extrémales</u>				
(En millième)				
	Pd	Ag	Cu	Au
E1	800	200	-	-
E2	800	-	200	-
E3	800	100	-	100
E4	800	-	100	100
E5	600	400	-	-
E6	600	150	250	-
E7	600	50	250	100
E8	600	300	-	100
E9	750	-	250	-
E10	650	-	250	100
G	700	130	120	50
M	600	200	100	100

3.1.4 Elaboration et caractérisation des alliages

Les alliages sont réalisés dans des conditions permettant de reproduire la structure métallographique des alliages utilisés par le praticien.

En odontologie la coulée des alliages s'effectue généralement par la technique dite de « coulée à la cire perdue ». Cette technique consiste en l'élaboration d'une maquette en cire de l'élément à réaliser qui sera ensuite moulé dans un matériau réfractaire. Après moulage, la cire est éliminée par chauffage puis remplacée par un alliage en fusion. Le retrait qui se produit lors du refroidissement de l'alliage est compensé par l'expansion du moule en céramique réfractaire. L'élément métallique obtenu sera donc la réplique exacte de la maquette en cire élaborée par le prothésiste. La figure ci-contre représente la micrographie d'un bridge coulé à la cire perdue prêt à être utilisé chez le patient (Figure 19).

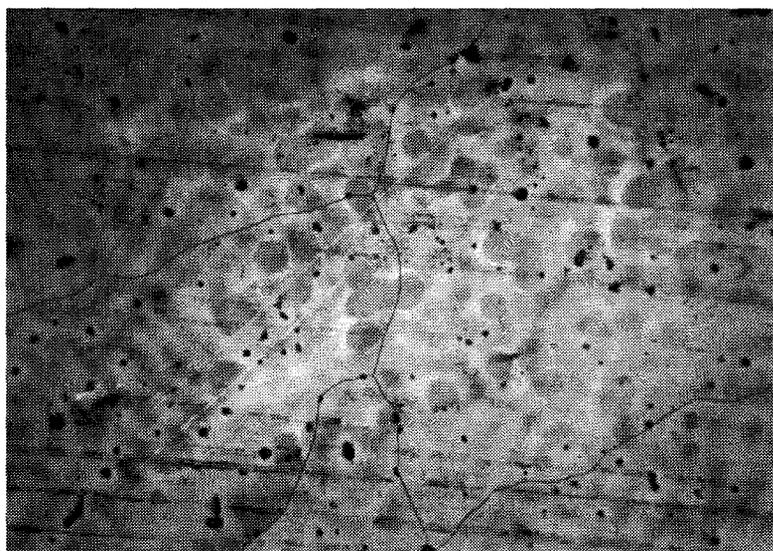


Figure 19 : Micrographie sur bridge de l'alliage EC 720 (X 200).

Pour les tests biologiques nous avons besoin de pastilles. Celles-ci sont obtenues à partir d'un barreau métallique. Ce barreau est réalisé avec le même alliage et la même technique de coulée afin de vérifier que la structure de l'alliage reste la même. La microstructure de l'alliage est caractérisée par micrographie ci contre (Figure 20). Nous constatons que la microstructure est différente de celle du bridge de référence (Figure 19). Nous voyons ici apparaître la présence d'une ségrégation de composition avec présence de zones sombres plus corrodables au niveau des joints de grains. L'alliage obtenu n'est donc pas représentatif de l'alliage présent au niveau d'un bridge réel. Cette différence peut s'expliquer par la masse importante (200g) de métal mise en œuvre pour réaliser le barreau. Cette masse implique des difficultés de coulée avec un nombre important de tiges de coulée et un positionnement de celles-ci qui doit être maîtrisé. Mais surtout la masse de métal importante se refroidit bien plus lentement que les quelques grammes nécessaires à la réalisation d'un bridge.

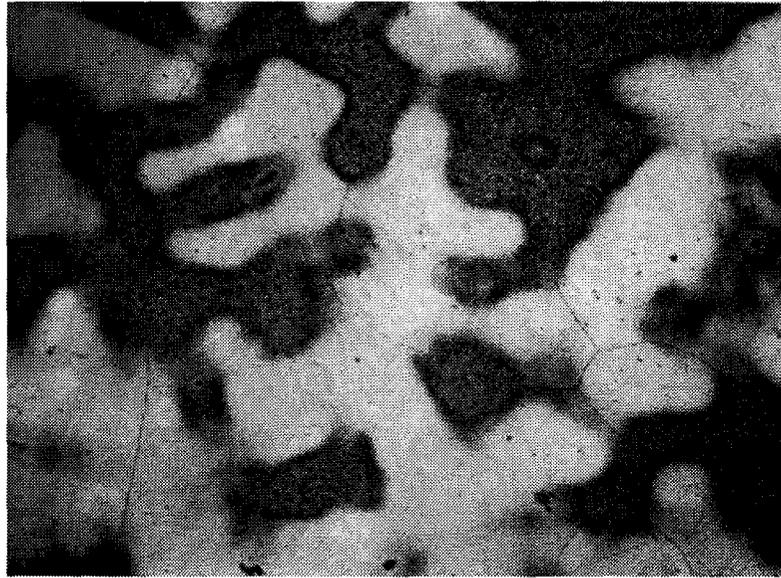


Figure 20 : Micrographie du barreau en alliage EC 720 coulé à la cire perdue (X200).

Pour obtenir une vitesse de refroidissement comparable à celle présente lors du refroidissement des bridges, les 200g de métal sont coulés dans une lingotière en métallique. La structure de l'alliage ainsi obtenue est caractérisée sur la micrographie ci dessous (Figure 21). La structure est alors comparable au bridge témoin. Trois autres alliages témoignent du même résultat (EC 520, EC 630, EC 430). C'est cette méthode que nous utiliserons pour la préparation des alliages.



Figure 21 : Micrographie du barreau en alliage EC 720 coulé dans une lingotière métallique (X200).

3.1.4.1 Préparation des alliages

Les métaux purs sont introduits dans un creuset en zircon puis placés dans un four à induction. La montée en température s'effectue dans une atmosphère inerte d'Argon pour éviter l'oxydation. La température du four est dans un premier temps bien supérieure à la température de fusion de l'alliage, pour que tous les métaux soient bien fondus. Dans un deuxième temps la température baisse (tout en restant supérieure à la température de fusion de l'alliage) de façon à bien homogénéiser le liquide.

Puis nous préparons le chemin de coulée en réchauffant les parois du creuset. Une fois cette opération effectuée, nous coulons le métal en fusion dans une lingotière (Cu,Cr_{4%}) préalablement recouverte d'un film de graisse de silicone, le démoulage s'en trouve facilité.

3.1.4.2 Préparation des pastilles

Après coulée et refroidissement du métal dans le moule cylindrique, le barreau est réduit à un diamètre de 15 mm puis est tronçonné en pastilles de 2 mm d'épaisseur. La découpe se fait par un disque en carbure de silicium de 0,4 mm d'épaisseur. Le déplacement de la ligne de coupe se fait tous les 2,5 mm. Les pastilles sont alors marquées au poinçon suivant la convention de notation choisie. Elles sont ensuite traitées thermiquement (Figure 22) pour les alliages qui le nécessitent, par des cycles de simulation de cuisson afin que la structure métallographique de ces échantillons corresponde à celle du produit utilisé et mis en place chez le patient. Les pastilles sont ensuite polies graduellement sur un papier au carbure de silicium jusqu'au grade 1200. Chaque pastille est débarrassée de ses particules par un passage aux ultrasons pendant 10 minutes, dégraissée à l'alcool, rincée à l'eau distillée puis stockée dans un dessiccateur.

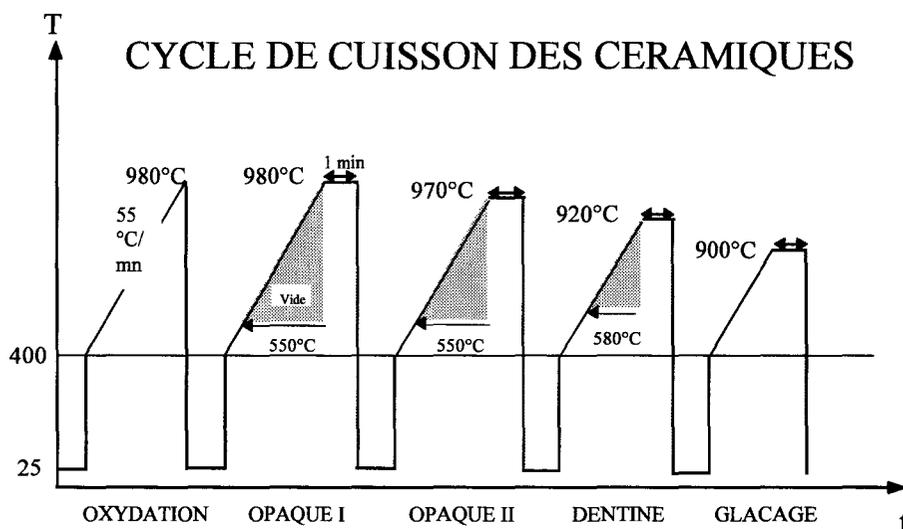


Figure 22 : Cycle de cuisson céramique Ivoclar.

3.1.4.3 Préparation des poudres

La poudre d'alliage est préparée manuellement à l'aide d'une fraise en carbure de tungstène. Cette méthode dénature très peu le matériau en évitant la formation d'oxydes qui seraient obtenus par atomisation. Les copeaux ainsi obtenus sont mis en suspension dans l'alcool absolu, les particules les plus fines sont récupérées après décantation. La poudre est ensuite rincée à l'eau milliQ, puis séchée à l'étuve (100°C). Les poudres sont caractérisées au Microscope Electronique à Balayage, le diamètre des particules est inférieur à 25 μm (Figure 23).

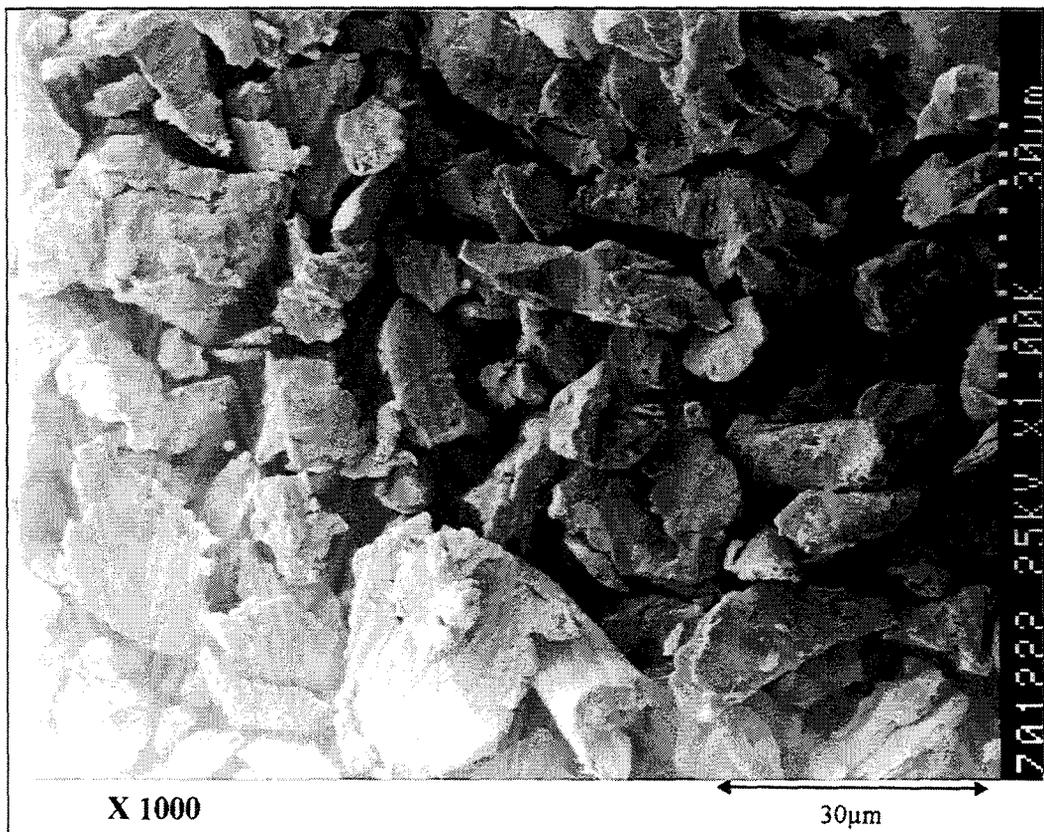
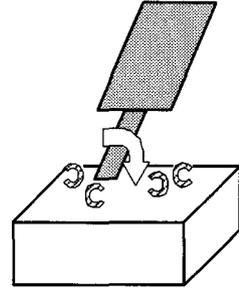


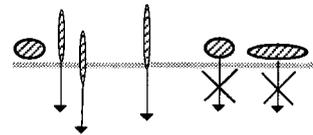
Figure 23 : Dimension des poudres métalliques caractérisée au MEB.

Préparation des poudres

Le bloc est débité à l'aide d'une meulette en carbure de tungstène massif.

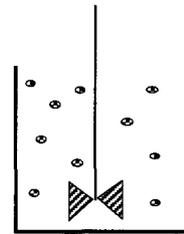


Les copeaux sont ensuite tamisés à 25 μm .

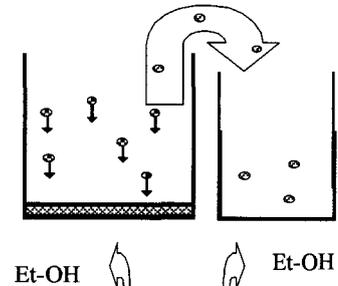


La poudre obtenue a une morphologie moyenne, en forme d'aiguilles de 20 μm de large sur 100 μm de long.

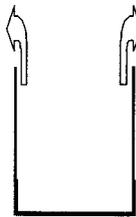
Afin d'obtenir des grains de taille plus modeste, cette poudre est mise en suspension dans 20 cc d'éthanol absolu (MERCK : "pour analyse").



Puis on laisse décanter 30 s, le liquide surnageant est récupéré.

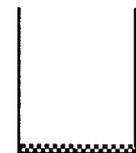


L'alcool est évaporé dans une étuve de 80 $^{\circ}\text{C}$ à ventilation.



La poudre ainsi obtenue est récupérée puis caractérisée au MEB.
=> Morphologie allongée, taille moyenne : 15 - 30 μm .

Acceptable pour le test de clonage.



3.1.4.4 Caractérisation de surface (confocale)

Les microscopes confocaux donnent une image haute résolution d'un plan de l'échantillon en trois étapes. Tout d'abord, la lumière est focalisée au moyen de l'objectif en un faisceau presque conique, de sorte que la région la plus lumineuse du faisceau soit située à une profondeur choisie dans l'échantillon. Ensuite, la lumière réémise (Figure 24) est refocalisée par l'objectif et passe par un diaphragme en trou d'épingle pratiqué dans un masque placé devant le détecteur. Le diaphragme bloque ainsi la quasi totalité des rayons lumineux qui proviennent des zones de l'échantillon situées au-dessus et en-dessous du plan focal. Finalement, le faisceau lumineux est déplacé d'un point à l'autre de l'échantillon jusqu'à ce que le plan focal entier ait été balayé [61]. Lorsque la lumière incidente provient d'un faisceau LASER, le microscope confocal LASER est particulièrement bien adapté pour donner une mesure précise des différents reliefs de surface de l'échantillon.

Après polissage au grade 1200 et préalablement à leur mise en culture, les pastilles de chaque alliage sont observées et caractérisées par la technique de microscopie confocale à balayage LASER (ZEISS, LASERTEK).

Sur chaque cliché la ligne horizontale continue représente la zone analysée. Les lignes pointillées correspondent à l'échelle du profil. Les notations « Manual » indiquent l'espacement entre les lignes pointillées verticales, « Depth » ou « Height », l'échelle de profondeur du profil entre les deux lignes discontinues horizontales. La profondeur totale de champ est signalée à gauche sur fond noir (Figure 25). L'objectif utilisé est indiqué par « LENS » ici X80.

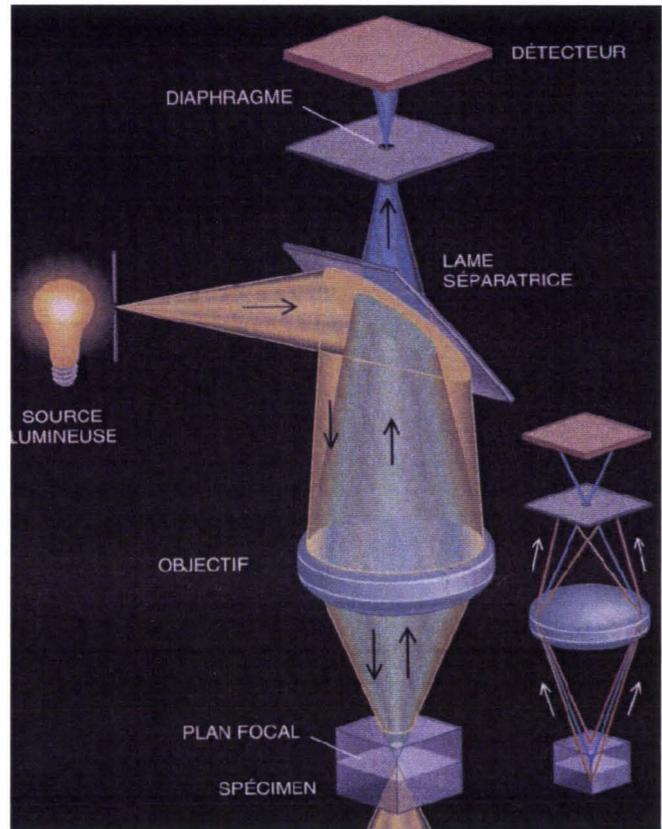


Figure 24 : Principe du microscope confocal [61].

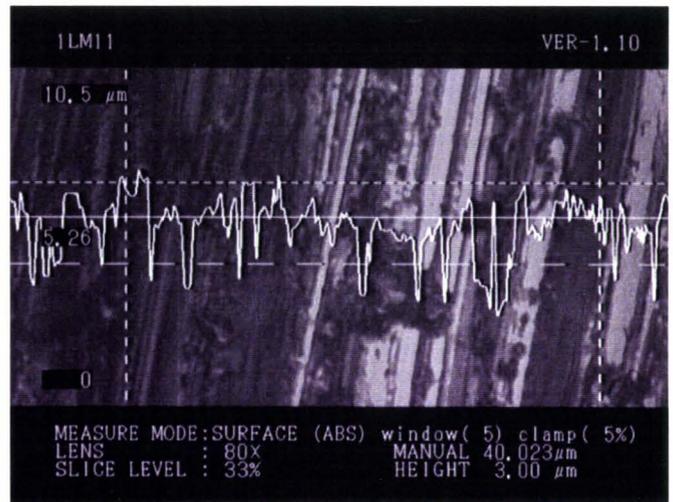


Figure 25 : Profil obtenu par microscopie confocale LASER d'un échantillon métallique poli sur papier SiC au grade 1200.

3.2 METHODES EXPERIMENTALES

3.2.1 Culture cellulaire

Les tests biologiques sont réalisés suivant la norme ISO 10993-5/EN 30993-5 [69]. Pour améliorer la reproductibilité des mesures, les cellules d'origine sont initialement congelées dans 30 tubes cryogéniques. Il sera donc possible d'utiliser les cellules d'origine pour les tests de cytocompatibilité qui s'étalent sur une période de trois ans. Un lot de sérum de veau est également prévu pour la période d'essai.

3.2.1.1 Prolifération cellulaire

Les tests de prolifération sont réalisés dans des boîtes de culture à 24 puits de 15 mm de diamètre (Costar). Les boîtes sont en polystyrène et correspondent aux standards internationaux et européens (ISO 10993-5 / EN 30993-5) [69]. Les échantillons à tester sont préalablement stérilisés à l'autoclave 135°C. Toutes les manipulations sont effectuées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Trois échantillons de chaque matériau sont disposés au fond des puits. L'essai comprend également trois témoins positifs constitués par des pastilles de nickel pur et trois témoins négatifs représentés par le fond du puits en polystyrène de la boîte de culture. Le test de prolifération est renouvelé 6 fois et le résultat s'établit par conséquent sur une moyenne de 18 échantillons.

Afin d'inoculer sur les éprouvettes des cellules en phase exponentielle de croissance, nous effectuons un repiquage 48 heures avant le test.

Les cellules sont placées sur les échantillons à une densité de 5700 cellules/cm² dans 1 ml de milieu de culture. Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 3 et 6 jours.

A la fin des périodes d'incubation (3 et 6 jours) les cellules sont détachées des échantillons avec 0,3 ml de trypsine (0,1% p/v) dans la solution de Hank's sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Le détachement s'effectue à 37°C pendant 5 minutes.

Les échantillons sont douchés à l'aide de 0,7 ml d'EDTA (1/5000) pour bien détacher les cellules du matériau. La suspension de 1 ml ainsi obtenue est homogénéisée à l'aide d'une pipette Pasteur par aspiration/rejet répétées.

La suspension cellulaire obtenue est comptée dans 8 ml d'Isoton à l'aide d'un compteur cellulaire Coulter Z1 (Coultronics). Chaque suspension cellulaire est comptée 3 fois.

Le pourcentage de prolifération de l'échantillon est ensuite calculé par rapport à celui du témoin négatif.

3.2.1.2 Viabilité cellulaire (Méthode du clonage)

Ce test consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et par conséquent la concentration létale 50% (LC50) en utilisant la méthode de formation de colonies [116,44,75]. Pour ce test nous utilisons la lignée cellulaire L132. Ces cellules sont très sensibles aux substances toxiques et réagissent avec une reproductibilité très constante [49]. Le témoin négatif est le Polytétrafluoroéthylène (PTFE) (réf. Goodfellow FP3060010) taille moyenne des particules : 6-9 μm . Le témoin positif est le nickel pur en poudre.

Les cellules poussent dans des boîtes de Pétri (diamètre 50 mm, Costar) à la densité initiale de 300 à 800 cellules/boîte de façon à obtenir en moyenne 100 colonies par boîtes en fin d'expérience. Les cellules sont incubées pendant 12 jours dans une étuve à 5% de CO_2 à 37°C dans 5 ml de milieu MEM supplémenté par 10% (v/v) de SVF.

L'exposition est continue et les concentrations sont variables, allant de 25 à 400 $\mu\text{g/ml}$ pour les poudres d'alliages et les métaux purs et de 5 à 80 $\mu\text{g/ml}$ pour le Ni. Au moins 6 expériences ont été réalisées pour chaque concentration. Le milieu de culture n'a jamais été renouvelé pendant la durée de l'expérience. Chaque expérience comporte 3 boîtes pour chaque concentration. En fin d'expérience, les cellules sont fixées et colorées avec le Cristal Violet. La survie des cellules exposées est calculée par rapport aux cultures témoins (100%). Ceci permet d'établir la concentration létale 50%, un critère précis pour la comparaison de l'effet cytotoxique de différentes substances [116] Une classification par ordre de cytotoxicité en résulte.

L'effet relatif de clonage (ERC) est calculé selon les formules suivantes et exprimé en % par rapport à la culture contrôle (concentration = 0 $\mu\text{g/ml}$)

$$(1) \quad \text{Culture contrôle} \quad C : \quad \frac{\text{nombre de colonies} \times 100}{\text{nombre de cellulesensemencées}} \quad = X_C\%$$

$$(2) \quad \text{Culture exposée} \quad E : \quad \frac{\text{nombre de colonies} \times 100}{\text{nombre de cellulesensemencées}} \quad = X_E\%$$

$$(3) \quad \text{ERC} (\%) = \frac{X_E \times 100}{X_C}$$

3.2.1.3 Test inflammatoire (Cellules Géantes Multinucléées)

Le test de réaction inflammatoire consiste à quantifier l'apparition de cellules géantes multinucléées (CGM) dans les cultures monocouches de cellules L132 (cellules épithéliales embryonnaires humaines, ATCC-CCL5) en présence de la poudre de la substance à tester.

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri (diamètre 50 mm, Costar) à la densité initiale de 7000 cellules/ cm^2 . Les cellules sont préalablementensemencées dans des boîtes de culture 48 heures avant le test afin que les cellules se trouvent dans une phase

exponentielle de croissance pour la manipulation. Nous utilisons du MEM de Eagle (Eurobio) enrichi à 10% (v/v) en sérum de veau fœtal (Eurobio) comme milieu de culture.

La concentration du produit à tester est celle de la concentration létale 50% (LC50) déterminée lors des expérimentations de survie cellulaire. Lorsque la LC50 n'est pas atteinte pour 400µg/ml nous utilisons cette concentration maximale.

Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 5 jours. En fin d'expérience, nous récupérons le milieu de culture que l'on congèle, et les boîtes sont colorées avec le violet cristal. Après séchage, les CGM sont comptées par zones de 800 à 1000 cellules (n = 10).

Le résultat pour chaque matériau est exprimé par la moyenne des différents comptages. Le résultat global est exprimé en % par rapport au nombre total de cellules.

3.2.1.4 Morphologie cellulaire (MEB)

Le test de morphologie cellulaire s'effectue sur des fibroblastes de tissu conjonctif de souris NIH3T3 (CRL 1658 de l'ATCC) en contact direct avec les échantillons métalliques. Le témoin négatif est le verre borosilicate. Le témoin positif est le nickel pur (Réf. Goodfellow NI000615, pureté 99,99%) sous forme de disques de 15 mm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur.

Les expériences sont menées en parallèle des tests de prolifération. Les cellules sontensemencées dans des plaques multipuits (24 puits de 15 mm de diamètre, Costar) contenant les échantillons, à la densité initiale de 5700 cellules / cm². Les cellules sont préalablementensemencées dans les boîtes de culture 48 heures avant le test afin que les cellules se trouvent dans une phase exponentielle de croissance pour la manipulation. Le milieu de culture est le MEM de Eagle modification de Dulbecco (Gibco), supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau nouveau-né décomplémenté (Eurobio).

Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 3 et 6 jours.

A la fin des périodes d'incubation (3 et 6 jours) les échantillons avec voile cellulaire sont fixés pour la microscopie électronique à balayage (MEB) avec du glutaraldéhyde (2.5% v/v) dans tampon Phosphate de sodium 0,1 M, suivi d'une postfixation par OsO₄(2%) / HgCl₂ saturé (6 volumes pour un volume respectivement).

Après déshydratation à l'alcool, les échantillons sont séchés par la méthode du point critique du CO₂ (Emscope CPD750), métallisés (Emscope SC500) et observés au MEB (Hitachi S500). L'observation s'effectue sous 25 kV et 75µA.

3.2.2 Méthodes électrochimiques

La caractérisation de la tenue à la corrosion d'un alliage implanté s'effectue par l'étude des paramètres suivants :

- Enregistrement de sa courbe de polarisation, qui permet de déterminer son aptitude à la passivation et de mesurer l'étendue du domaine de passivité. Le potentiel imposé par le potentiostat varie de -1250 à 1250mV/ECS à la vitesse de 10mV par minute de telle sorte que l'on puisse considérer chaque instant comme un état d'équilibre pour mesurer le courant qui circule entre l'électrode auxiliaire de platine et l'échantillon.
- couplage galvanique, simulation du phénomène de polymétallisme en bouche. L'électrode auxiliaire de platine est remplacée par un échantillon en or dentaire ou en titane commercialement pur.
- mesure de sa vitesse de repassivation, qui permet d'évaluer la vitesse de reformation du film protecteur en cas de rupture accidentelle. Ce paramètre constitue un critère de qualité important, représentatif du comportement pratique d'un matériau passivable.

Les échantillons sont polis au grade 1200 avec du papier SiC puis nettoyés aux ultrasons dans l'éthanol pendant 10 minutes avant le début de l'essai.

Pour évaluer la tenue à la corrosion des échantillons, deux milieux ont été choisis d'après la norme NF S.91-141/ISO 10271 [70,71]. Il s'agit d'une solution de NaCl à 0,9% et d'une salive artificielle multicomposants (Tableau 12).

Tableau 12 : Composition de la salive artificielle.

Composants	Concentration
Na ₂ HPO ₄	0,260 g/l
NaCl	0.700 g/l
KSCN	0.330 g/l
KH ₂ PO ₄	0,200 g/l
NaHCO ₃	1,500 g/l
KCl	1,200 g/l

3.2.2.1 Mesures effectuées avec le bioréacteur

Le bioréacteur est un dispositif de mesures électrochimiques conçu par la firme Inceltec-SGI France (Toulouse) en fonction d'un cahier des charges établi par notre laboratoire. Il a l'avantage de pouvoir être utilisé en condition stérile. La température de la solution est contrôlée et maintenue à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Le bioréacteur permet de travailler sous atmosphère contrôlée, ceci par un mélange de 4 gaz (O_2 , N_2 , CO_2 , AIR). Pour la suite des essais nous choisirons de travailler en milieu désaéré dans une atmosphère d'azote 99,99% de pureté. Le pH de travail choisi est de 6,7 suivant la norme NF91-141 [70] et est maintenu à 0,01 unité de pH par le régulateur du bioréacteur. Cette régulation s'effectue par addition de CO_2 au gaz vecteur d'azote pour acidifier la solution et par addition de NaOH (0,01N) pour augmenter le pH, ceci par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. Le dispositif permet également le maintien d'une agitation constante par l'intermédiaire d'une pale en rotation. Les différentes caractéristiques de contrôle choisies pour les essais électrochimiques sont récapitulées dans le tableau ci dessous (Tableau 13).

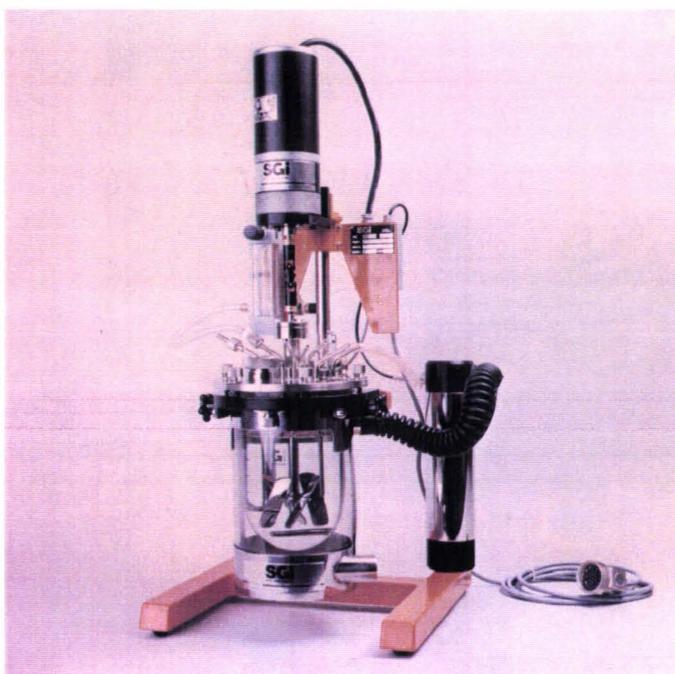


Figure 26 : Bioréacteur.

Tableau 13 : Conditions physico-chimiques établies pour les essais électrochimiques.

Paramètres	
Electrolytes :	NaCl 0,9% ou Salive artificielle (cf. Tableau 12)
Température :	$37^{\circ}\text{C} \pm 0,1$
Atmosphère :	N_2 (99,99)
pH :	$6,70 \pm 0,01$
Agitation :	30 Tours/mn

Couplé à un potentiostat, le dispositif permet d'obtenir les courbes de polarisation des alliages et également de mesurer leur potentiel libre. Le dispositif électrochimique est constitué d'un montage potentiocinétique à trois électrodes et d'une cellule électrochimique de volume utile de 650 ml. Les 3 électrodes sont: l'électrode de travail qui est l'échantillon à étudier, l'électrode de référence et une électrode auxiliaire en platine. L'électrode de référence est une électrode Ag/AgCl dont le potentiel par rapport à l'électrode normale à hydrogène est de +197 mV (électrode KMS1, Sensortechnik Meinsberg GmbH, Waldheim, RFA). Dans le cas des alliages base Palladium, les tests ont consisté en l'étude des polarisations globale et anodique ainsi que le potentiel d'abandon des alliages.



Figure 27 : Electrode double : de travail et de Pt.

3.2.2.2 Polarisation globale

En utilisant le montage potentiocinétique, il est possible d'obtenir l'intensité du courant qui traverse l'échantillon en fonction du potentiel qui lui est appliqué. La vitesse de balayage étant très faible (10 mV/min), elle permet de considérer chaque instant comme un état d'équilibre pour mesurer le courant. La polarisation commence à -1200 mV/Ag/AgCl après un décapage cathodique de 10 min et se poursuit jusqu'à +1200 mV/Ag/AgCl.

L'observation de la courbe permet de déterminer le potentiel de corrosion (E_c) et le potentiel de rupture (E_r).

Le tracé de la courbe en coordonnées logarithmiques permet de déterminer l'intensité du courant critique (I_c) qui correspond au courant nécessaire pour passiver l'éprouvette. L'aptitude à la passivation augmente lorsque I_c diminue.

Le potentiel est contrôlé à l'aide du potentiostat PGP 201 et de l'électrode de référence Ag/AgCl.

3.2.2.3 Polarisation anodique

Pour réaliser les essais de polarisation anodique, l'échantillon est plongé dans l'électrolyte préalablement désaérée. Le potentiel de l'échantillon est mesuré après 2h, puis nous effectuons un léger décapage cathodique à -500 mV pendant 10 minutes afin de rendre la surface de l'échantillon plus homogène et d'améliorer la reproductibilité des résultats. L'échantillon est à nouveau abandonné pendant 2h, le potentiel se stabilise et l'on débute la polarisation de cette valeur de potentiel jusqu'à 1200 mV.

En utilisant le montage potentiocinétique, il est possible d'obtenir l'intensité du courant qui traverse l'échantillon en fonction du potentiel qui lui est appliqué. La vitesse de balayage étant très faible (10 mV/min), elle permet de considérer chaque instant comme un état d'équilibre pour mesurer le courant.

L'observation de la courbe permet de déterminer le potentiel de rupture (E_r).

Le tracé de la courbe en coordonnées logarithmiques permet de déterminer l'intensité du courant critique (I_c) qui correspond au courant nécessaire pour passiver l'éprouvette. L'aptitude à la passivation augmente lorsque I_c diminue.

3.2.2.4 Potentiel d'abandon

L'éprouvette est introduite dans l'électrolyte sans décapage cathodique préalable. Le potentiel d'abandon (E_a) est mesuré après 24 heures à l'aide d'un potentiostat PGP 201 (Radiometer-Tacussel, Copenhague, DK).

Cette valeur permet de classer les alliages les uns par rapport aux autres en fonction de leur caractère plus ou moins noble. Ce potentiel ne donne aucune valeur sur la vitesse de corrosion.

3.2.2.5 Potentiel d'abandon 10 mesures

Cet appareil permet de mesurer le potentiel libre de 10 échantillons plongés ensemble dans la même solution. Il est donc possible, en mettant 10 pastilles du même alliage, de déterminer une valeur moyenne de son potentiel libre. Les mesures sont réalisées sur 48 heures à 37°C , en désaéré sous azote, dans une solution de NaCl à 0,9%. Le pH de départ est de 6,7 et peut atteindre 8,2 en fin d'expérience. Le potentiel est mesuré à l'aide d'une électrode de référence au calomel saturé (ECS) dont le potentiel par rapport à l'électrode normale à hydrogène est de $+241$ mV.

3.2.2.6 Indice de nobilité.

Une étude de Susz [92] propose un indice de nobilité (IN), destiné à prédire le comportement de la corrosion en bouche d'un alliage à partir des courbes de polarisation dans une zone à risque définie entre le potentiel de corrosion et 0,5 V/ECS. Cette étude conclut à un très bon comportement des alliages à base de palladium (IN de 86 à 95), même lorsque ces alliages contiennent peu ou pas d'or. Par contre l'indice chute de 55 à 64 pour les alliages Ag-Pd. Pour comparaison, un alliage Ni-Cr a un indice de nobilité de 35.

Cet indice de nobilité sera utilisé pour classer nos alliages à base de palladium, afin de permettre une corrélation avec la réponse biologique des alliages.

3.2.3 Relargage

Les extraits sont obtenus par dissolution ionique dans une solution de H₂O avec une surface de contact de 3cm²/ml. Les solutions sont analysées par une torche à plasma ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) Cette méthode présente de nombreux avantages :

- analyse multi élémentaire
- large domaine d'analyse (du µg/l au g/l)
- diminution des effets de matrice (peu d'interférence)

Ces différents paramètres permettent une détection limite de l'ordre d'une dizaine de ppb voire même du ppb pour certains éléments.

L'analyse qualitative d'un élément repose sur l'analyse des raies du spectre d'émission. L'analyse quantitative se fait par l'estimation de l'intensité des raies directement proportionnelle à la concentration en atome de l'élément considéré. Il est donc nécessaire d'étalonner l'appareil avec des solutions de concentration connues. Trois à quatre concentrations de solutions standards sont recommandées.

L'excitation des éléments à analyser se fait au moyen d'un plasma d'argon. Ce plasma est induit par une étincelle d'électrons. Ces derniers, accélérés par un champ magnétique alternatif, entrent en collision avec les atomes d'argon et les ionisent, le plasma peut alors s'auto-entretenir.

Les hautes températures du plasma peuvent atteindre 10.000K (Kelvin), assurant ainsi la complète atomisation des échantillons à analyser.

Nos échantillons ne contenant que quatre éléments, Palladium, Cuivre, Argent et Or, le choix des raies correspondantes n'a posé aucun problème de recouvrement. Les raies choisies pour nos analyses sont :

Pd : 340,458nm
Cu : 324,754nm
Ag : 228,068nm
Au : 242,795nm

**4 ETUDE DE LA
CYTOCOMPATIBILITE
DES ALLIAGES
COMMERCIAUX**

Les alliages commerciaux sont des alliages déjà commercialisés par l'entreprise ENGELHARD-CLAL et toute l'étude physico-chimique a déjà été effectuée par cette entreprise. Cependant la mise sur le marché de ces alliages en tant que matériaux implantables nécessite depuis fin 98 l'obtention du marquage CE, ce qui est un gage de qualité pour le consommateur. L'obtention de ce marquage passe par la réalisation de tests de cytocompatibilité normalisés. Les normes recommandent 2 tests. Cette exigence est donc à l'origine de notre étude. Cependant pour mieux apprécier la réponse biologique de ces alliages, nous choisissons de réaliser 4 tests de cytotoxicité. Dans ces conditions l'établissement d'un classement entre ces alliages nous sera facilité.

4.1 REALISATION DES ESSAIS

Dans le laboratoire du GRB, nous testons *in vitro* sur cultures cellulaires de multiples biomatériaux. Les tests de cytotoxicité *in vitro* sont définis par des normes internationales et européennes ISO 10993-5 et EN 30993-5 [69] qui proposent une gamme de tests dont le choix dépend de la nature des éprouvettes à évaluer, du site potentiel d'utilisation et de la nature de l'emploi du biomatériau.

Les tests retenus sont les suivants :

- 1 Prolifération cellulaire pour déterminer l'adhésion cellulaire
- 2 Altération morphologique révélée par Microscope Electronique à Balayage (MEB).
- 3 Viabilité cellulaire pour établir la concentration létale 50%, test quantitatif et hautement spécifique et fiable puisqu'il permet une comparaison concrète entre les substances testées.
- 4 Apparition de cellules géantes multinucléées en culture monocouche pour révéler un éventuel effet inflammatoire.

4.1.1 Prolifération cellulaire

Tous les échantillons ont été testés par la méthode de prolifération ou croissance cellulaire en contact direct, à deux temps d'exposition différents : 3 et 6 jours.

Dès qu'un échantillon testé induit une prolifération supérieure à 30% après une exposition de 3 jours, nous constatons une augmentation de la prolifération pour une durée de culture de 6 jours (Tableau 14).

Par contre, lorsque la prolifération à 3 jours est inférieure à 25%, la croissance cellulaire à 6 jours diminue encore davantage, ce qui révèle un ralentissement notable de la prolifération et peut traduire une toxicité de l'échantillon, si aucun autre phénomène n'entre en compte, comme par exemple l'adhésion.

Les alliages pour couronnes métallo-céramiques semblent avoir une meilleure réponse que les alliages conventionnels (Figure 28). Ceci peut s'expliquer à première vue par leur forte teneur en or ou en palladium.

Nous pouvons également noter qu'une forte teneur en cuivre de 20% pour GS 830 dans un alliage Ag-Au semble être très défavorable. Ce même phénomène se retrouve dans les alliages EC 640 et EC 650 également riches en cuivre.

Tous les alliages induisent un taux de prolifération supérieur à celui du Nickel qui est utilisé comme témoin positif. Ce taux est de 16% et 3% pour 3 et 6 jours respectivement.

Tableau 14 : Prolifération de Fibroblastes NIH 3T3 en contact direct avec les pastilles d'alliages commerciaux (n=6).

Prolifération cellulaire				
Référence EC	3 jours	E-typ	6 jours	E-typ
EC 910	55%	4%	70%	7%
EC 920	46%	5%	57%	6%
EC 930 BIO	47%	5%	60%	13%
EC 940 BIO	51%	4%	66%	7%
EC 950	27%	9%	24%	9%
EC 710	47%	7%	72%	7%
EC 720	44%	9%	55%	5%
EC 730	46%	7%	73%	13%
EC 740	61%	7%	76%	7%
EC 510	47%	5%	75%	8%
EC 520	41%	4%	67%	10%
EC 530	50%	6%	73%	8%
EC 540	56%	5%	69%	5%
EC 550	60%	5%	67%	8%
EC 820	43%	8%	73%	3%
EC 830	52%	7%	75%	8%
EC 850	29%	4%	35%	5%
EC 860 Bio	51%	7%	77%	9%
EC 610	48%	4%	70%	8%
EC 620	35%	6%	41%	6%
EC 630	29%	4%	31%	8%
EC 640	20%	1%	4%	0%
EC 650	21%	2%	4%	0%
EC 660 Bio	40%	7%	59%	8%
EC 410	47%	5%	68%	7%
EC 420	41%	5%	67%	8%
EC 430	34%	16%	42%	16%
EC 450	47%	8%	46%	11%
EC 460	36%	7%	60%	6%
EC 210	59%	4%	80%	6%
PV2	73%	12%	88%	8%
GP 1040	34%	8%	52%	7%
GP 1115	52%	7%	90%	5%
GS 700	46%	7%	83%	3%
GS 830	17%	2%	15%	9%
Nickel	16%	2%	3%	1%

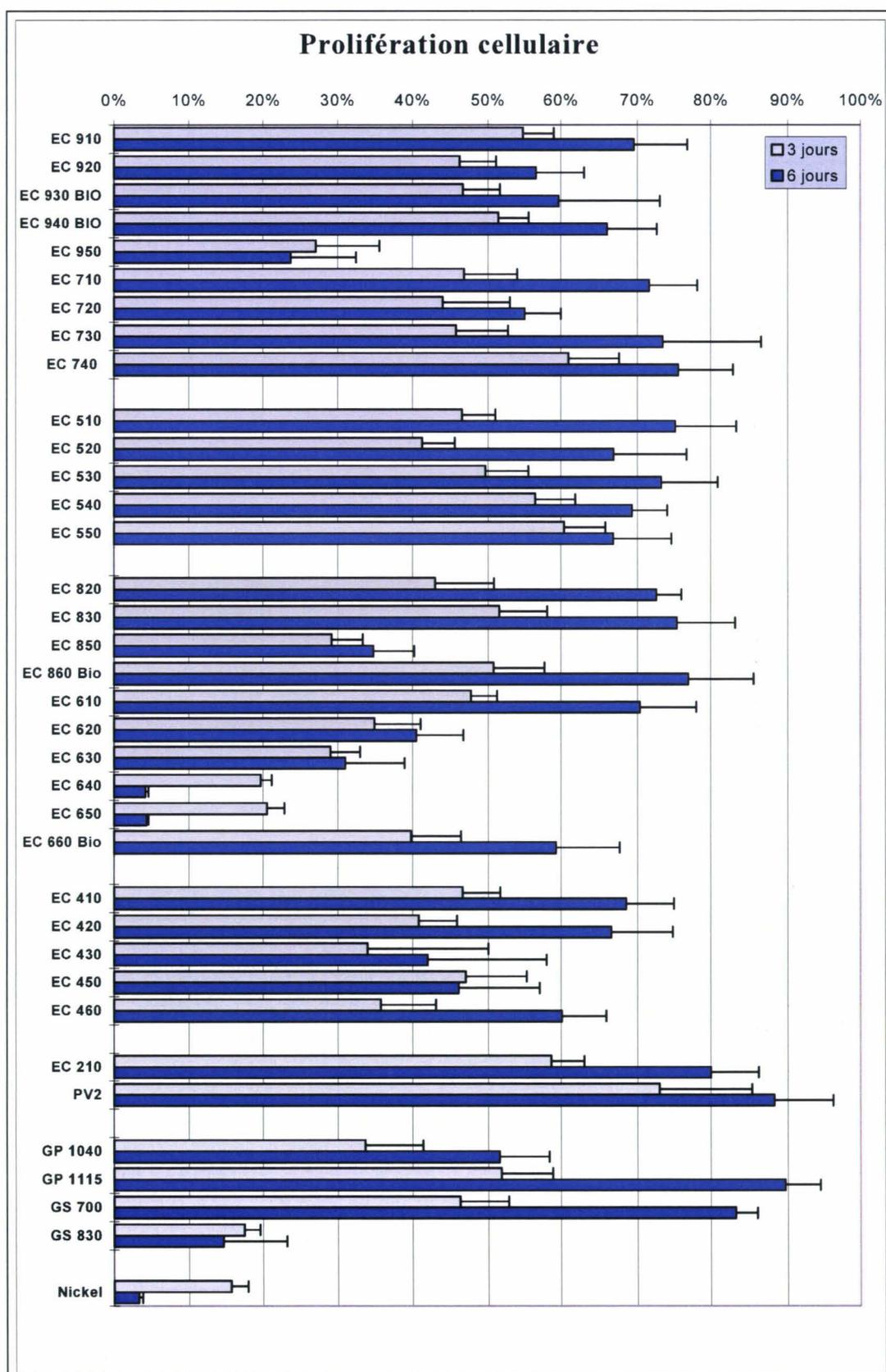


Figure 28 : Prolifération de fibroblastes NIH 3T3 en contact direct avec les pastilles d'alliages commerciaux (n=6).

4.1.2 Viabilité cellulaire

Les courbes de viabilité (Figure 29) ont été effectuées sur les mêmes 36 alliages commerciaux. Cependant il n'a été possible de déterminer la LC50 que pour 2 alliages, GP 700 et GP 830, ceci malgré la très forte concentration utilisée de 400 µg/ml en poudre métallique (Figure 30 -A et -B).

Tous les alliages étant de composition noble, ils ne présentent qu'une très faible cytotoxicité. En conséquence le classement des alliages s'effectuera en prenant la valeur de l'effet relatif de clonage (ERC) des cellules L132 à 400 µg/ml (Tableau 15).

La réponse la plus défavorable (37%) est obtenue pour une brasure GS 700 qui possède la plus forte teneur en Zinc₍₁₂₀₎ dans un alliage base Au₍₇₂₅₎ - Ag₍₁₀₀₎. Un effet défavorable est également constaté pour une seconde brasure GS 830 qui a un ERC de 50% à 400µg/ml. Cette seconde brasure possède la plus forte teneur en Cuivre₍₂₀₀₎ de la gamme EC dans un alliage base Au₍₆₀₀₎ - Ag₍₁₅₀₎. Le classement se poursuit par un alliage de métaux précieux blancs qui obtiennent une ERC de 55%. Cet alliage EC 430 Ag₍₅₅₅₎ - Pd₍₃₀₀₎ - Cu₍₁₀₀₎ possède la plus forte teneur en Argent de la gamme.

Tous les autres alliages ont un ERC supérieur à 70% pour la concentration de 400µg/ml de poudre métallique (Figure 31). Le Nickel, quant à lui, atteint la LC50 pour 40µg/ml et obtient un ERC très faible (5%) pour une concentration de 400 µg/ml de poudre de nickel.

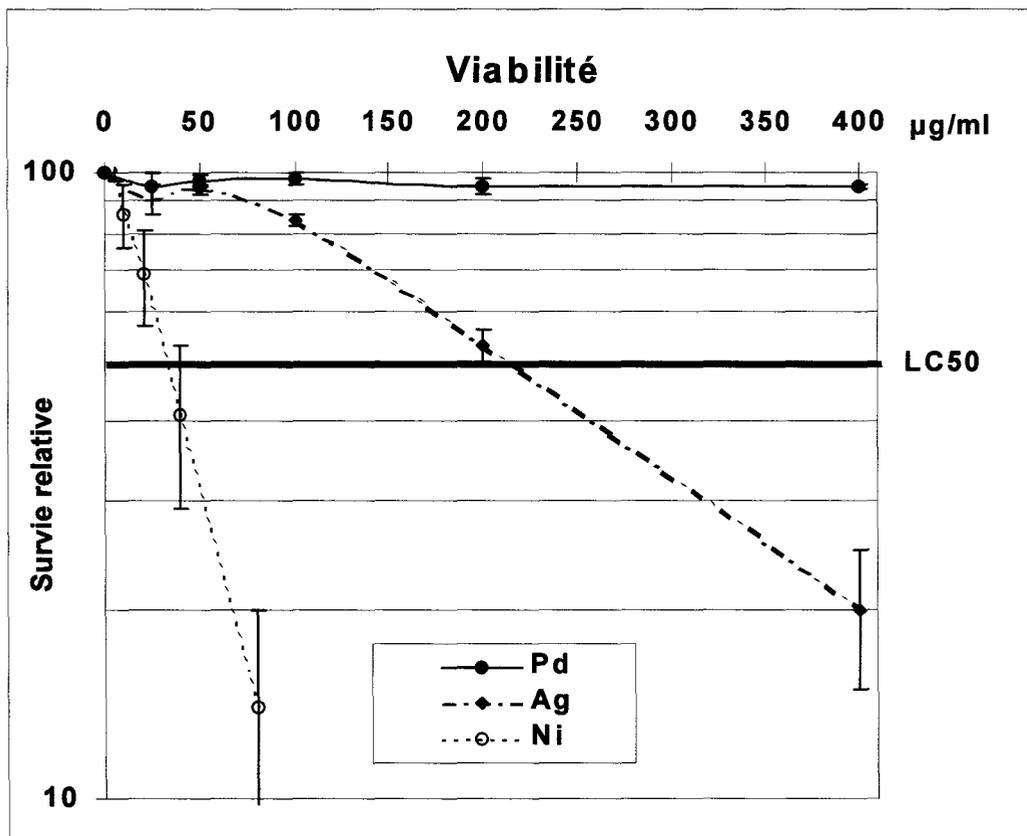
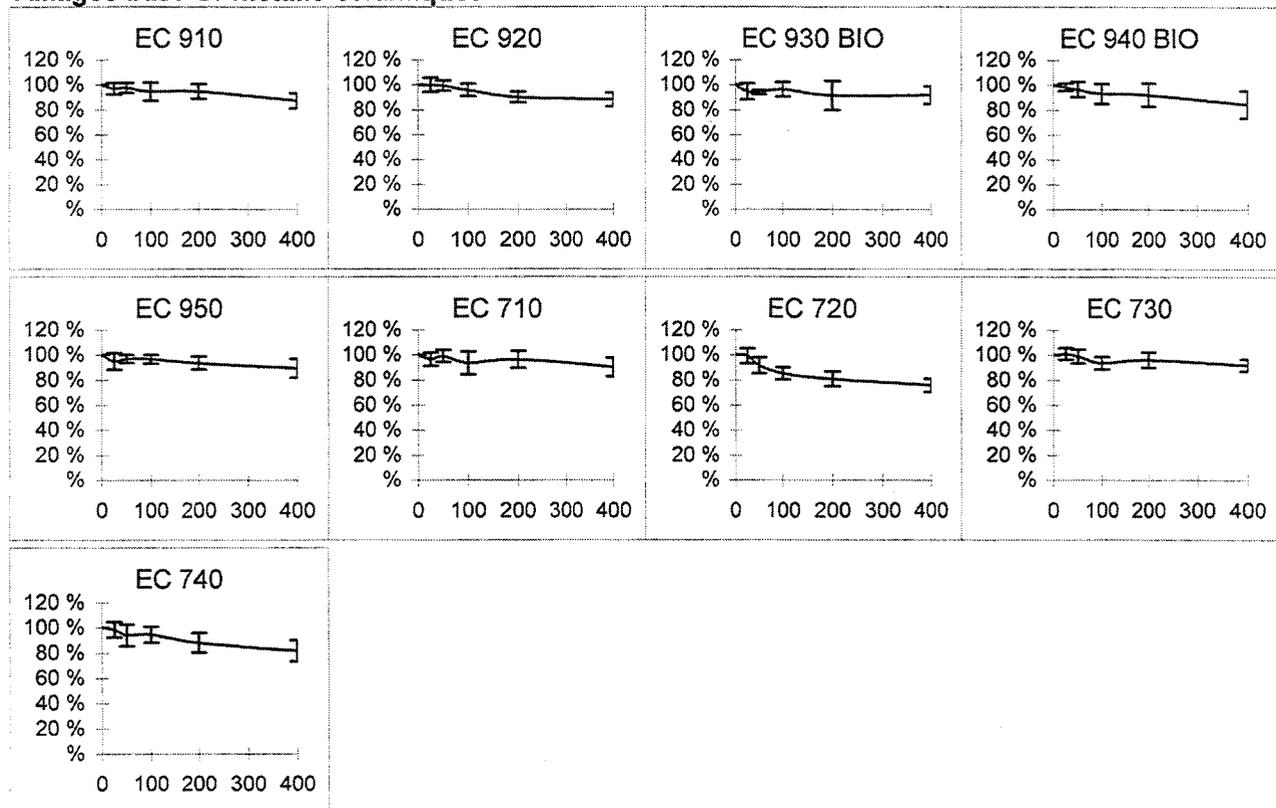


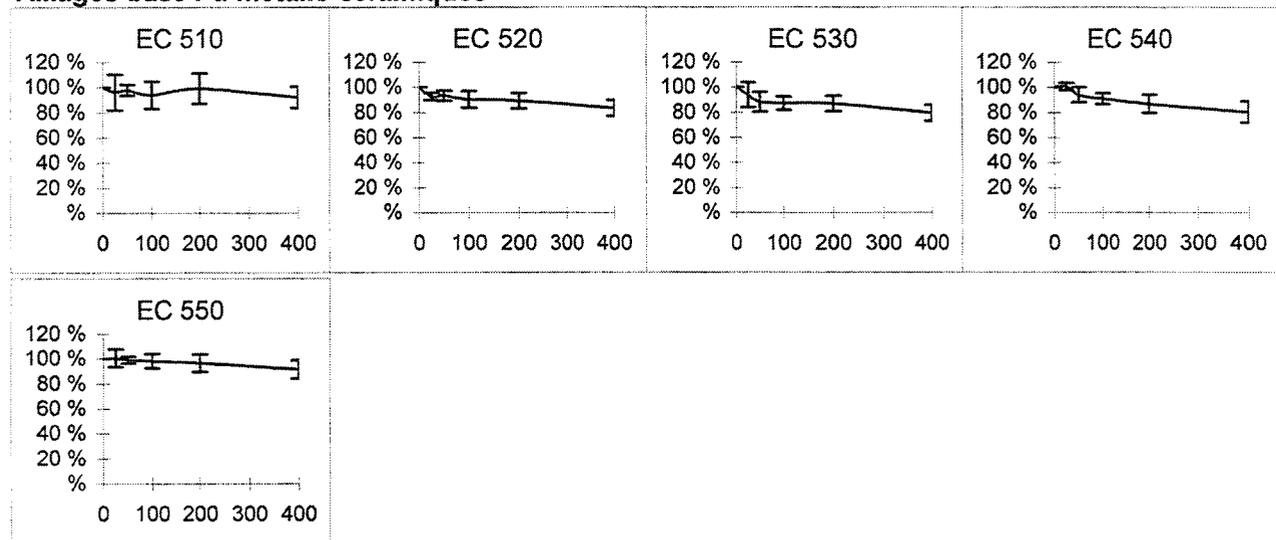
Figure 29 : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique (n=6).

Viabilité

Alliages base Or métal-céramiques



Alliages base Pd métal-céramiques



Alliages spéciaux

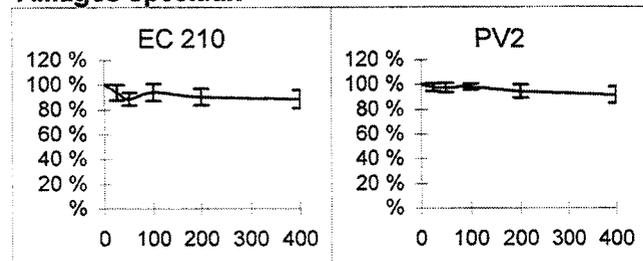
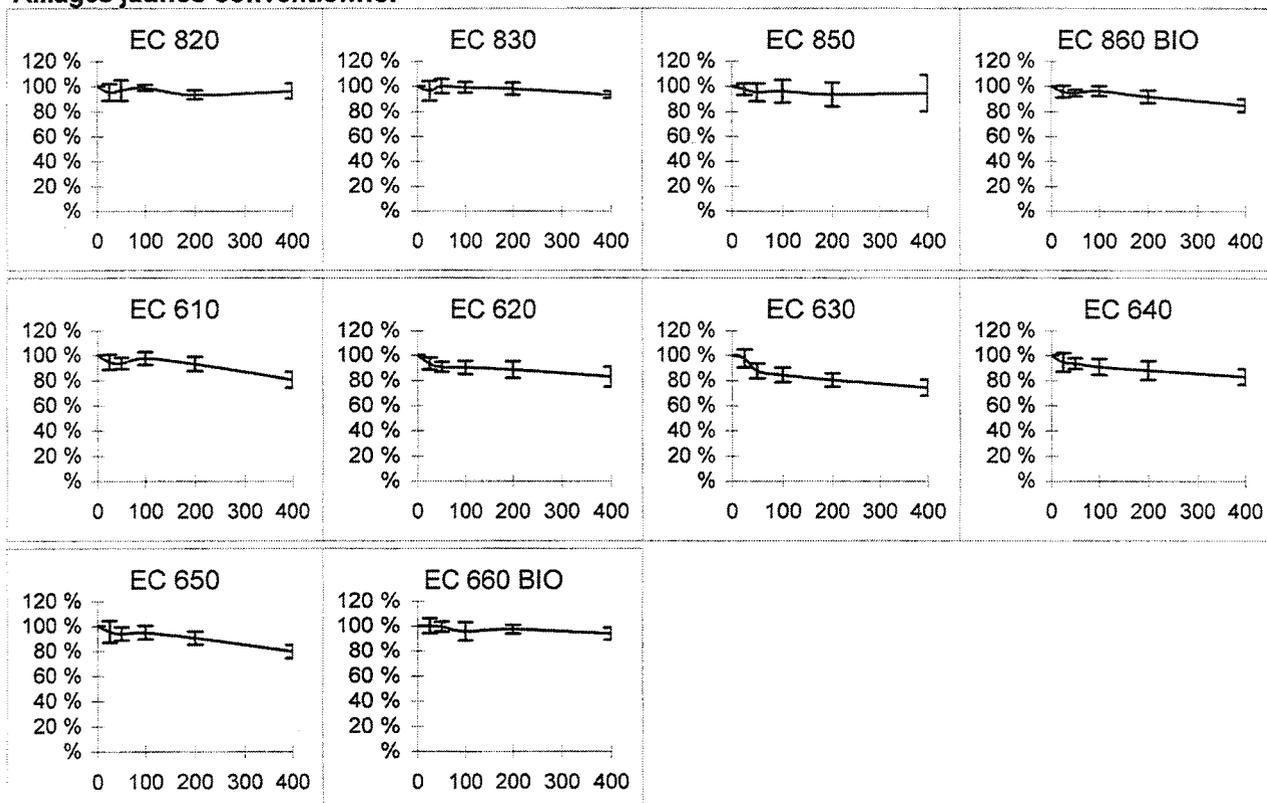


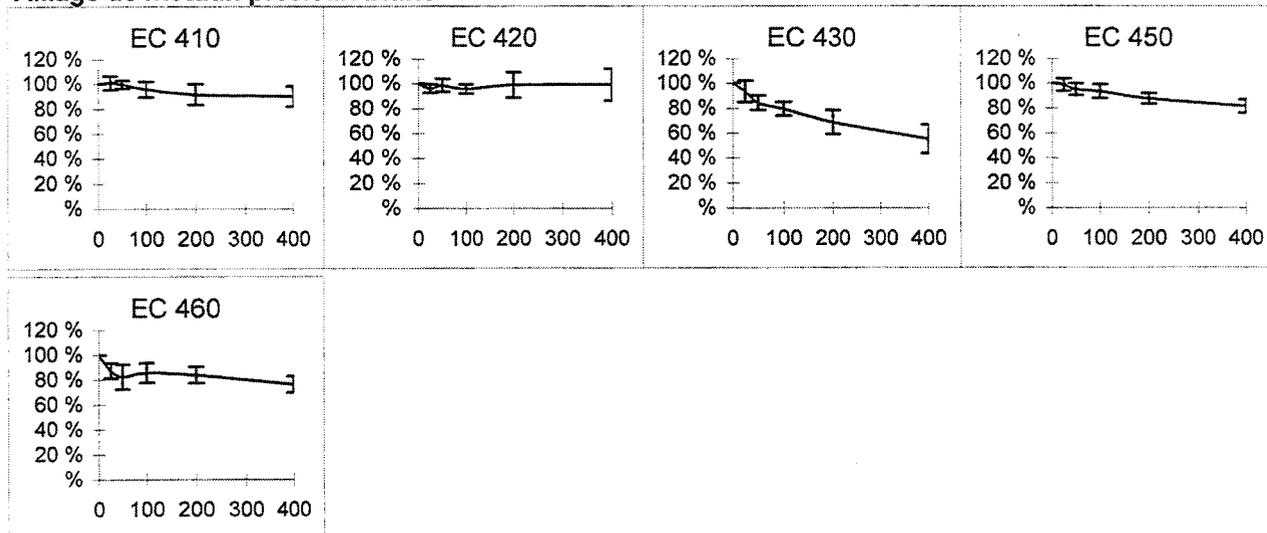
Figure 30-A: Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages commerciaux (n=6).

Viabilité

Alliages jaunes conventionnel



Alliage de métaux précieux blanc



Brasures

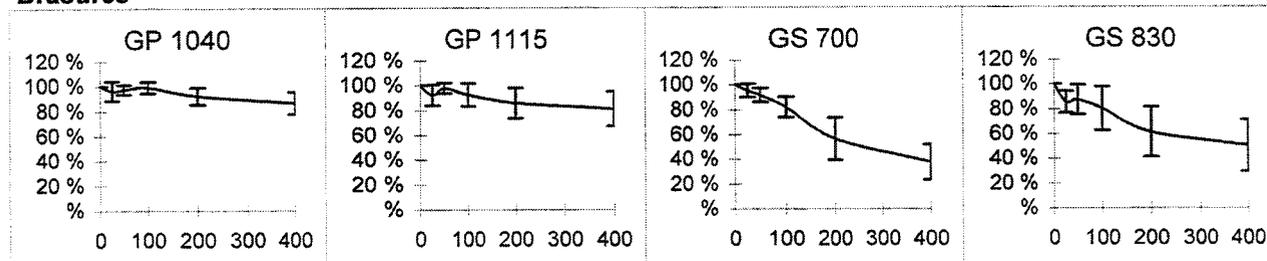


Figure 30-B : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages commerciaux (n=6).

Tableau 15 : Effet relatif de clonage (ERC% \pm SD) des cellules L132. Cellules clonées en présence continue de 400 μ g/ml de poudre des alliages de la gamme EC.

Viabilité 400 μ g/ml			
Référence EC	Désignation	Viabilité	E-type
EC 910	DIAZERAM	87%	6%
EC 920	DIAZERAM SF	88%	5%
EC 930 BIO	ADORBOND P300	92%	7%
EC 940 BIO	ADORBOND G	85%	11%
EC 950	ADORBOND LF	89%	7%
EC 710	ADORBOND S	90%	8%
EC 720	CERAMZYL	76%	5%
EC 730	CERAMZYL 51	92%	5%
EC 740	PGX 45	82%	8%
EC 510	ADORPALL 3	92%	8%
EC 520	ACTAZERAM 2	83%	6%
EC 530	PALZERAM	80%	6%
EC 540	PG 80	81%	9%
EC 550	ACTAZYL	91%	7%
EC 820	INLAY MEDIUM	96%	6%
EC 830	DENTOZAN M	93%	3%
EC 850	INLAY EXTRA HARD	95%	14%
EC 860 BIO	ADOR PF	85%	5%
EC 610	COLINOR 2	81%	6%
EC 620	ENGELHARD 444	83%	8%
EC 630	CLAFORZAN M	74%	6%
EC 640	BAKER 455	83%	6%
EC 650	BAKER 340	80%	5%
EC 660 BIO	ADOR PF	94%	5%
EC 410	DENTOZYL 4	90%	8%
EC 420	DENTOZYL	99%	13%
EC 430	FORZADEN M	55%	12%
EC 450	PALLACAST ECO	82%	5%
EC 460	EC 460	90%	8%
EC 210	MAGNET ECLA	88%	7%
PV2	PV2	91%	7%
GP 1040	GP 1040	86%	9%
GP 1115	GP 1115	81%	14%
GP 700	GP 700	37%	14%
GP 830	GP 830	50%	21%
Ni	Nickel	1%	0%

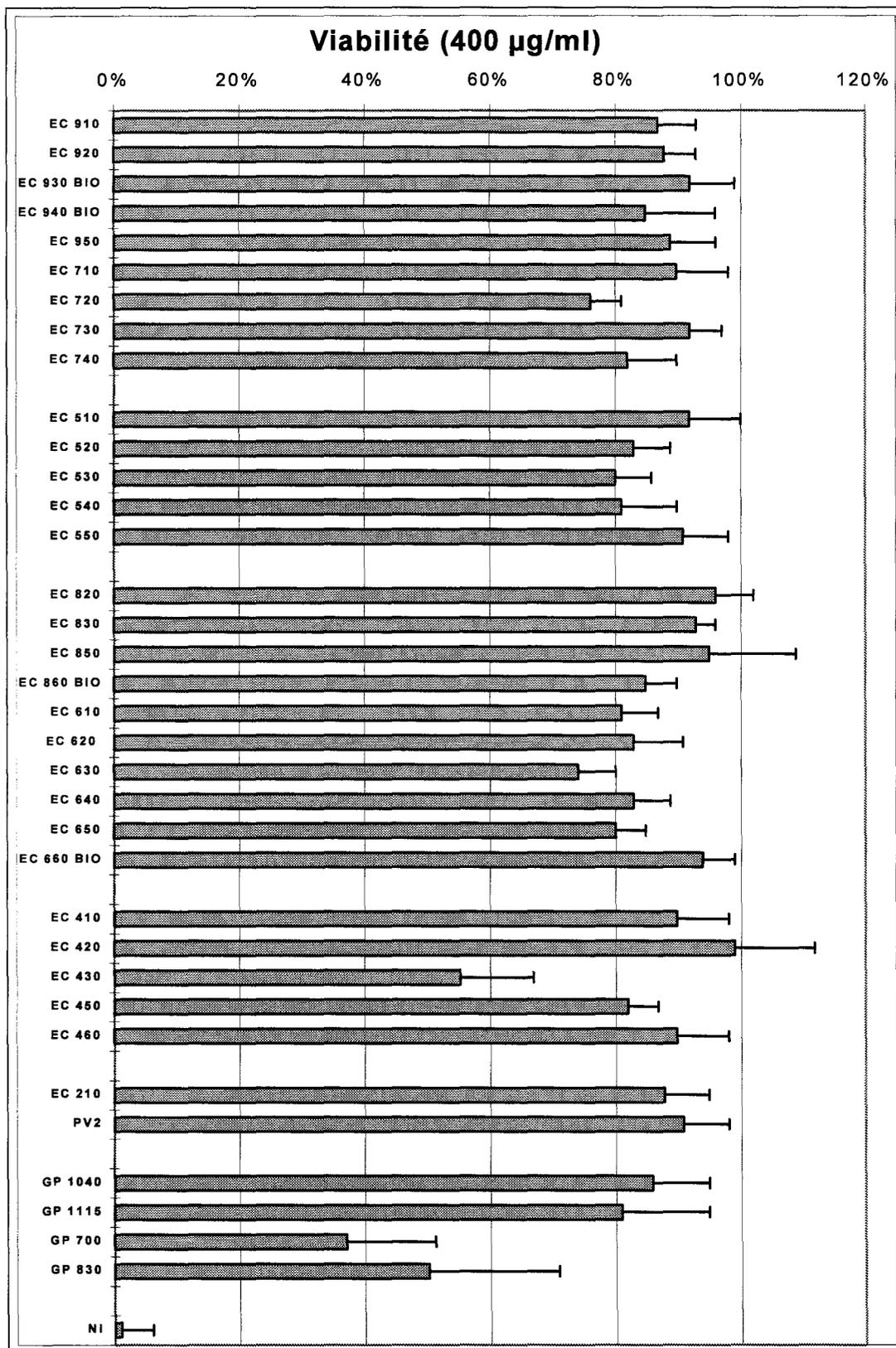


Figure 31 : Effet relatif de clonage (ERC% ± SD) des cellules L132. Cellules clonées en présence continue de 400 µg/ml de poudre des alliages de la gamme

Pour comparer nos résultats de viabilité, nous nous référons pour une partie aux résultats déjà obtenus par le laboratoire sur des métaux purs et alliages couramment utilisés en implantologie (Figure 32). L'évaluation de la viabilité de Al_2O_3 est également prise en compte car l'alumine est généralement utilisée pour le sablage des éléments prothétiques avant la pose de la céramique. Nous constatons ici l'absence de cytotoxicité de l'alumine.

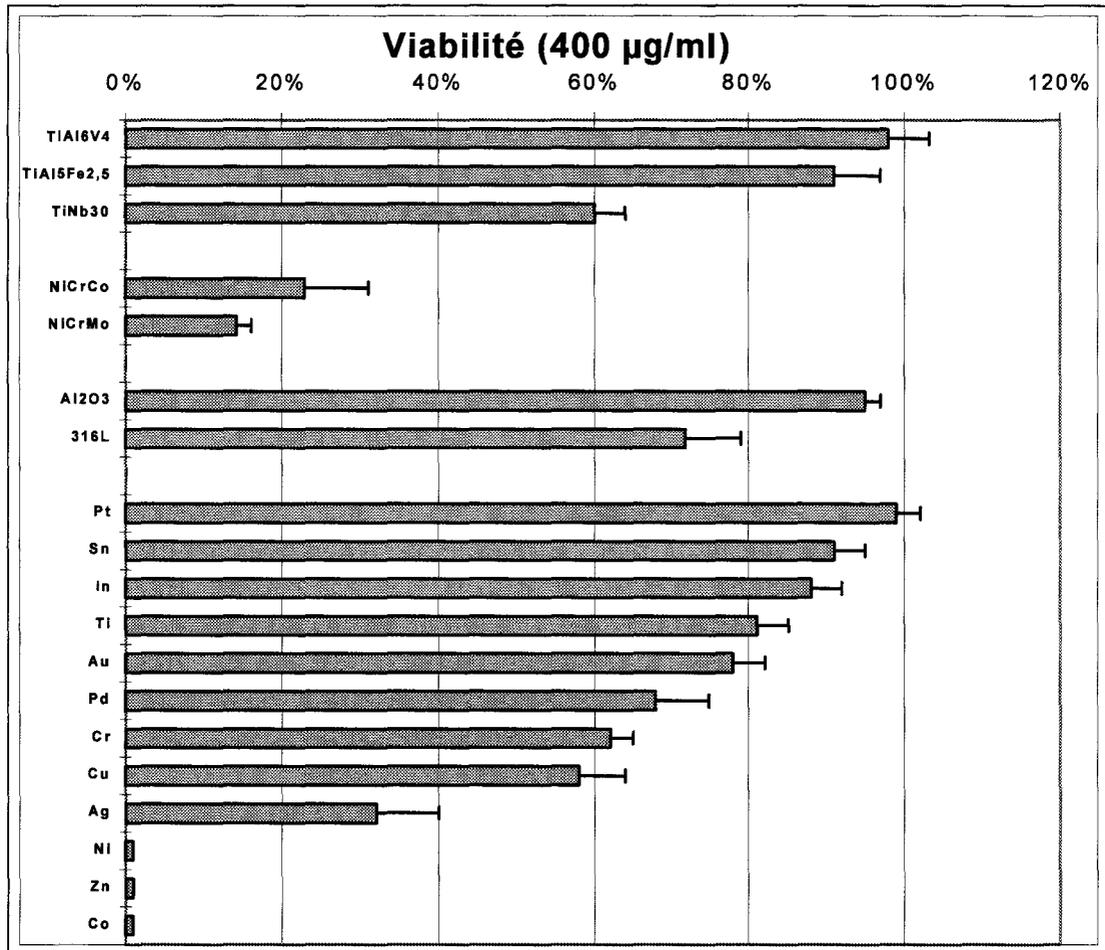


Figure 32 : Effet relatif de clonage (ERC% ± SD) des cellules L132 clonées en présence continue de 400 µg/ml de poudre d'alliages et de métaux purs.

4.1.3 Morphologie cellulaire

Dans un premier temps et d'un point de vue macroscopique, le tapis cellulaire est visiblement orienté parallèlement aux stries de polissage de l'échantillon métallique (Figure 33). Cette orientation se retrouve sur tous les alliages de la gamme étudiée et ne dépend apparemment pas de la composition de l'alliage. Il s'agit donc d'un effet mécanique. Les cellules s'orientent lors de leur locomotion dans les «rails» formés par les stries de polissage de l'échantillon (1 μ m de profondeur). L'étendue du tapis cellulaire est variable selon les échantillons, donc susceptible d'être un facteur de classement. Cependant le tapis cellulaire monocouche présente des espaces intercellulaires très variables d'un échantillon à l'autre, ce qui ne permet pas de quantifier cette surface pour classer les échantillons.

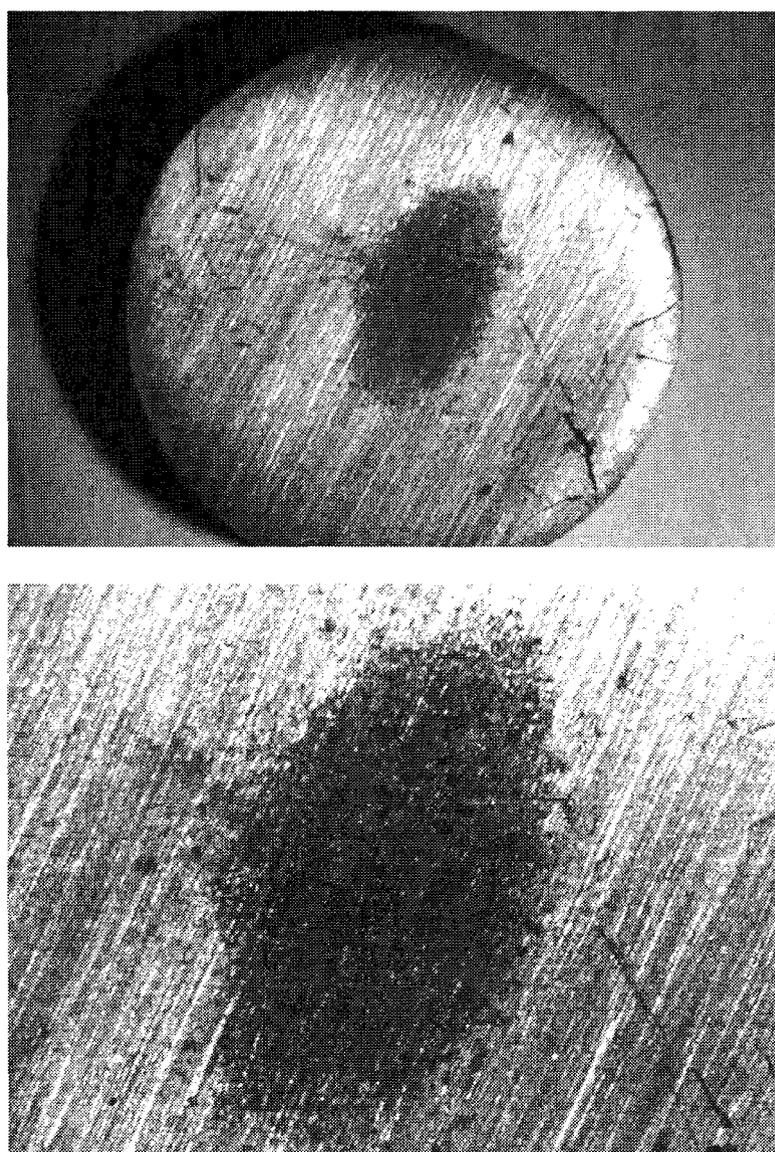


Figure 33 : Orientation macroscopique du tapis cellulaire suivant les stries de polissage unidirectionnelles de l'échantillon (diamètre de la pastille = 15 mm).

Dans un deuxième temps, l'étude de la morphologie se porte sur le plan microscopique où l'on retrouve l'orientation cellulaire suivant les stries de polissage (Figure 34).

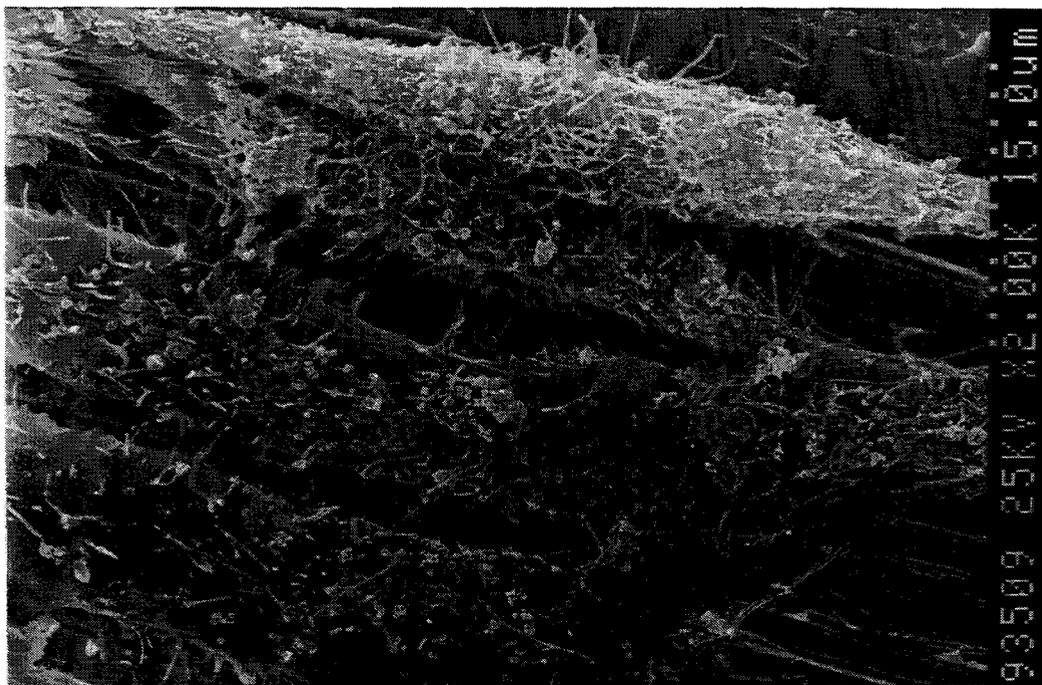


Figure 34 : Orientation microscopique des cellules NIH 3T3 suivant les stries de polissage unidirectionnelles de l'échantillon métallique (MEB, X2000).

L'étude ultrastructurale va permettre d'évaluer la morphologie cellulaire suivant un critère qualitatif permettant de classer la morphologie en trois catégories : morphologie cellulaire normale, morphologie cellulaire légèrement altérée, morphologie cellulaire altérée. Les critères pris en compte pour évaluer l'altération des cellules sont l'adhésion cellulaire, la présence de spicules, de pseudopodes et de lamellipodes traduisant une locomotion des cellules et un état fonctionnel normal.

La morphologie cellulaire est établie simultanément avec le test de prolifération et est déterminée par des observations au microscope électronique à balayage (MEB). Les cellules témoins sont cultivées sur des lamelles en verre boro-silicates. Des éprouvettes en Nickel pur sont utilisées comme témoin positif.

Les cellules NIH 3T3 individuelles normales possèdent une forme allongée ou triangulaire et une taille moyenne de 10 à 15 μm en largeur et de 20 à 30 μm en longueur. Leur bonne adhésion est caractérisée par la présence de *lamellipodes*, c'est à dire des projections de front qui adhèrent fortement sur le substrat et tirent le corps cellulaire par des contractions cytoplasmiques. Ces extensions sont nécessaires pour la locomotion cellulaire : un fibroblaste avance environ de 40 μm /heure. La partie postérieure des cellules mouvantes est caractérisée par des *pseudopodes* étroits et allongés qui sont finalement rétractés pendant le déplacement. Ils peuvent également casser sous des conditions physiologiques normales laissant quelques résidus cytoplasmiques derrière la cellule. La surface cellulaire montre de

nombreuses *microvillosités* et/ou *évagination sphériques* d'un diamètre de 0,1 μm et d'une longueur allant jusqu'à 1 μm . Ces évaginations augmentent sensiblement la surface cellulaire et par conséquent la possibilité d'échanges de la cellule avec le milieu extracellulaire. Finalement, nous observons de longs *spicules* d'un diamètre de 0.1 μm et d'une longueur de 5 à 10 μm . Ces structures sont considérées comme des organites sensoriels pour explorer l'environnement extracellulaire (Figure 35 et Figure 36).

La morphologie cellulaire peut être altérée en rapport avec une adhésion cellulaire diminuée ou un effet toxique. Ceci est caractérisé par une détérioration progressive des organites de surface décrits ci-dessus (Figure 37). Dans le pire des cas, les cellules prennent un aspect totalement détérioré, deviennent aplaties sans plus aucune évagination, menant à la perte d'adhésion et par conséquent à la mort inévitable, annoncée par la présence de multiples lésions membranaires et zones de cytolysse (Figure 38).

Les résultats sont exprimés qualitativement en 3 classes (Tableau 18):

- Morphologie cellulaire normale (cultures témoin) : (N)
- Morphologie cellulaire légèrement altérée : (LA)
- Morphologie cellulaire altérée : (A)

A 3 jours d'exposition, deux alliages induisent une morphologie **altérée** et un alliage une morphologie **légèrement altérée**. La morphologie altérée se retrouve pour la brasure GS 830 Au-Ag riche en cuivre (20%). Nous la retrouvons également pour un alliage jaune céramo-métallique EC 950 Au-Ag-Pt contenant 7% (Cu-Zn). La morphologie légèrement altérée apparaît pour l'alliage EC 620, un alliage jaune à teneur en or réduite Au₆₀₀-Ag₂₂₀-Cu₁₂₅. Tous les autres alliages ne provoquent aucune altération morphologique.

A 6 jours d'exposition, 7 alliages produisent une morphologie **altérée** comprenant les trois alliages cités ci-dessus ayant déjà provoqué une altération morphologique à 3 jours. Les 4 autres alliages se répartissent en deux classes de composition :

L'alliage EC 930 et la brasure GS 700 *base or* contenant Pt₁₆₀ et Zn₂₁ pour l'un et Ag₁₀₀-Cu₂₉-Zn₁₂₀ pour l'autre. Les alliages à bases de Palladium, EC 520 (Pd₇₈₅-Cu₁₀₀-Ga₈₀) et EC 510 (Pd₇₄₂ Ag₆₅ Sn₈₀ Ga₄₅).

La morphologie **légèrement altérée** a pu être constatée sur 9 alliages, ces alliages possèdent pour la plupart une forte teneur en Argent. Les 19 alliages restant respectent une morphologie normale.

Quant au Nickel, il induit une morphologie cellulaire fortement altérée après 3 et 6 jours de culture.

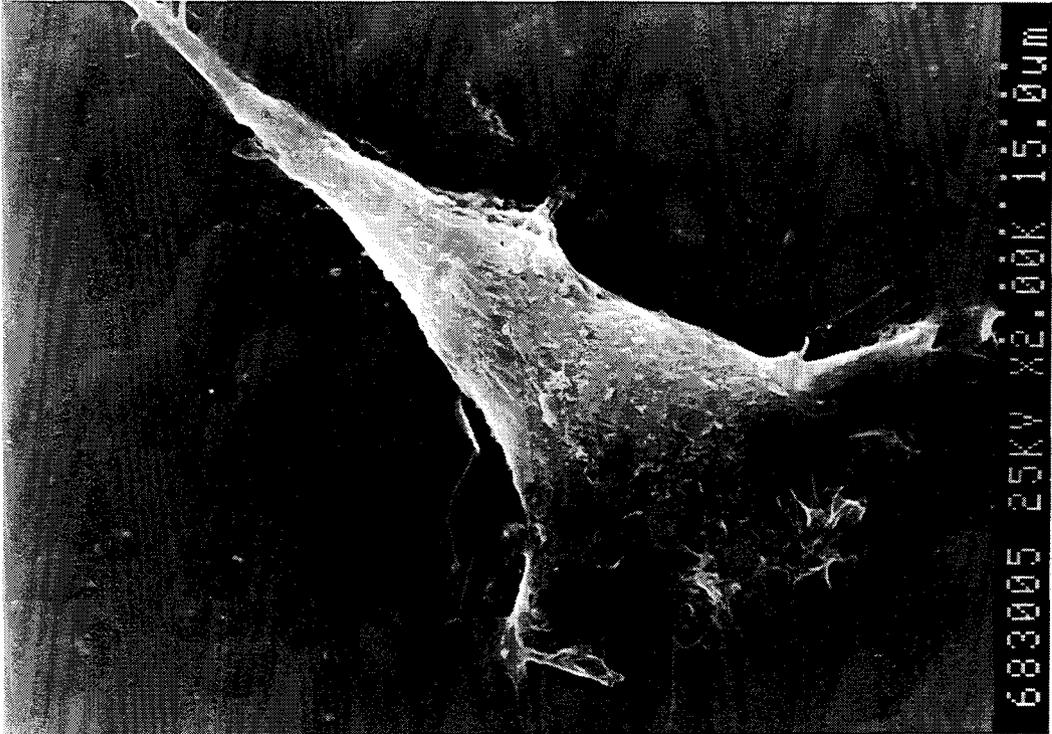


Figure 35 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 cultivé sur du verre borosilicate (contrôle). Nous remarquons la présence de nombreux spicules et évagination de la surface cellulaire, ce qui témoigne d'une bonne activité cellulaire.

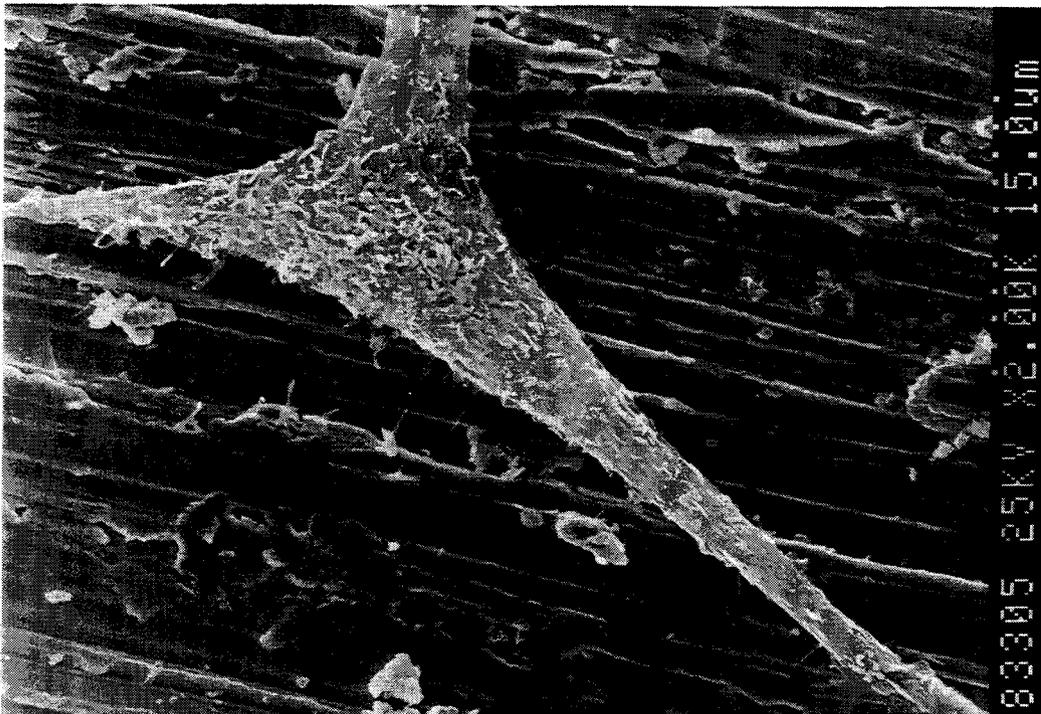


Figure 36 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 normal cultivé sur un alliage précieux ou semi-précieux. Les spicules et les évaginations de la membrane cellulaire sont comparables à celles des cellules témoin.

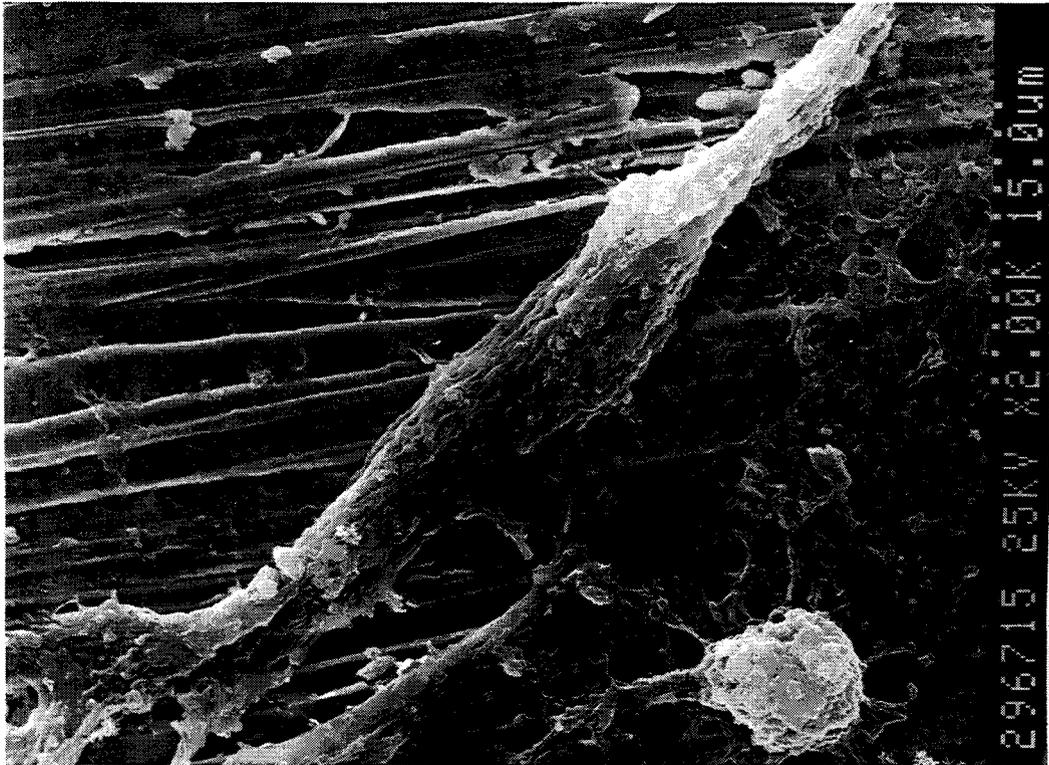


Figure 37 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 Légèrement altéré par le support métallique avec disparition des spicules.

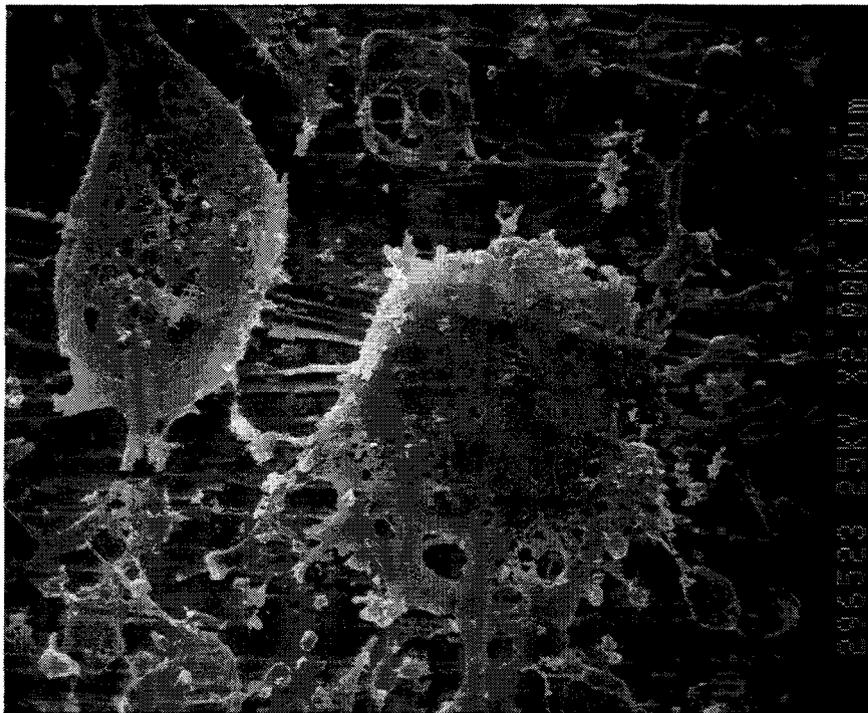


Figure 38 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 Altéré avec lyse de la membrane cellulaire.

4.1.4 Evaluation de l'effet inflammatoire

Le test de réaction inflammatoire consiste à quantifier les cellules géantes multinucléées (CGM) dans les cultures monocouches de cellules L132 cultivées en présence d'une poudre du matériau à tester pendant 5 jours. Cette méthode révèle des modifications morphologiques dans une culture cellulaire par l'apparition de CGM, qui est directement reliée à une altération physiologique, voir fonctionnelle des cellules (Figure 39).

Ces cellules peuvent apparaître dans une culture témoin de cellules L132 (Figure 39). Mais leur fréquence ne dépasse pas 2% par rapport à l'ensemble des cellules cultivées, ceci dans les conditions les plus défavorables : 8 jours sans changement de milieu.

La concentration utilisée est celle de la concentration létale 50% (LC50) déterminée lors des expériences de survie cellulaire pour utiliser une concentration qui induit le même effet cytotoxique. Dans le cas qui est le nôtre où la LC50 n'est pas atteinte en raison d'une bonne cytocompatibilité, nous employons la concentration la plus forte utilisée pour les tests de viabilité, c'est à dire de 400µg/ml. Nous examinons les cellules colorées par le violet cristal au microscope photonique et nous comptons le nombre de CGM par boîte. Le test est répété 6 fois. Une poudre de Ni pur est utilisée comme témoin positif. Les résultats sont exprimés en % de CGM dans les cultures exposées par rapport aux cultures témoins.

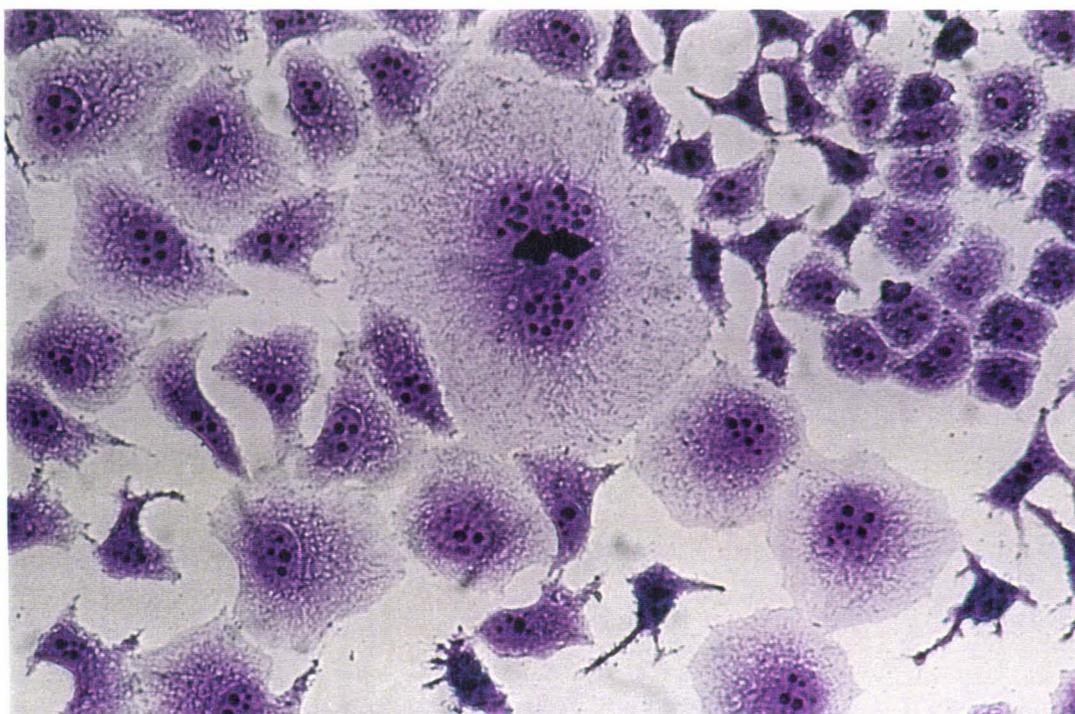


Figure 39 : Morphologie caractéristique d'une cellule géante multinucléée dans une culture témoin de cellules épithéliales L132.

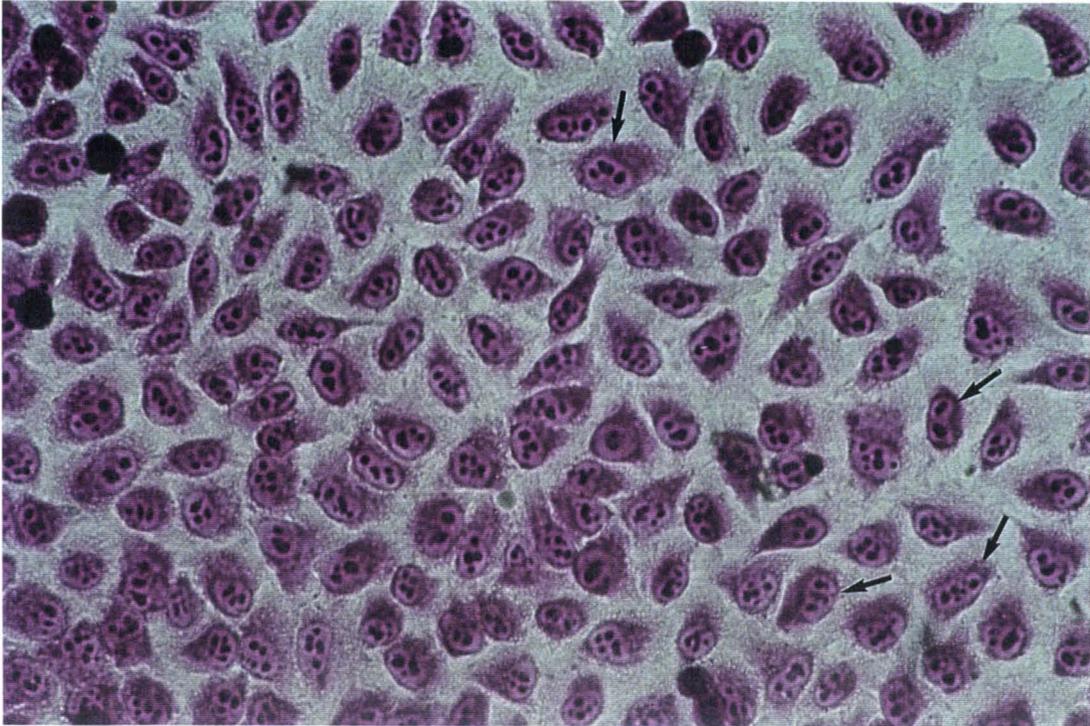


Figure 40 : Vue d'ensemble d'une culture de cellules L132 témoin. Noter la présence de quelques cellules binucléées (flèches)

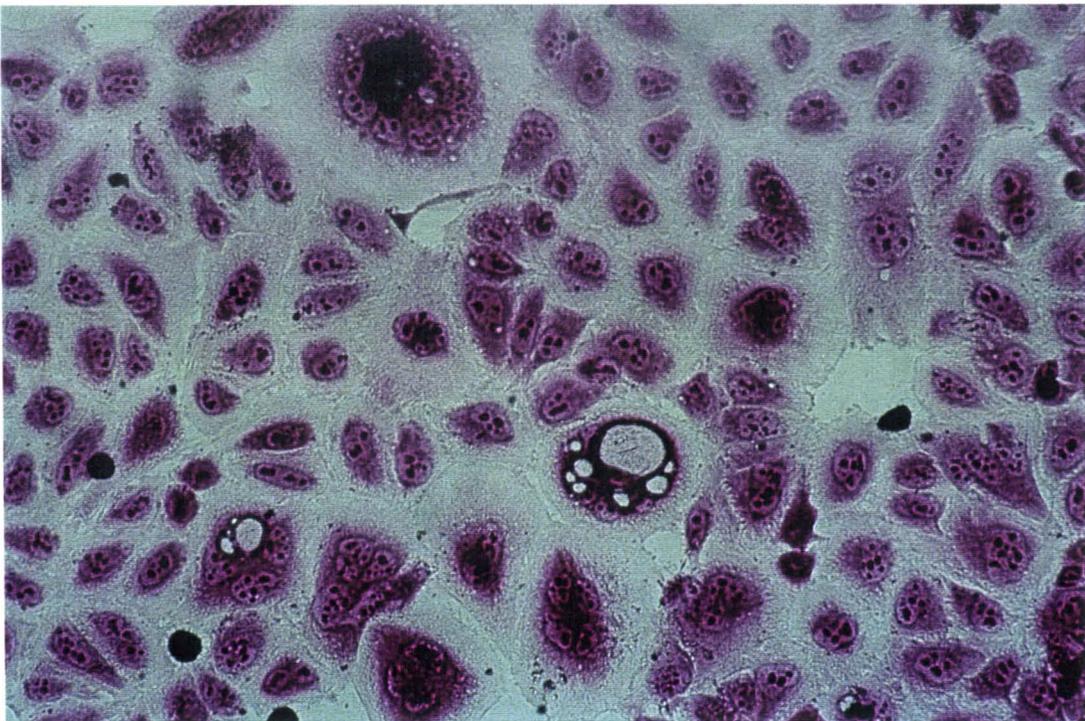


Figure 41 : Vue d'ensemble d'une culture de cellules L132 en présence d'une poudre de Ni. Noter la présence de plusieurs cellules géantes multinucléées et de cellules vacuolisées. Ces dernières témoignent d'un effet cytotoxique.

Ce test inflammatoire a été réalisé sur tous les alliages commerciaux de la gamme EC. Nous rappelons que les témoins ont un taux de CGM approximatif de 1,5 % (Figure 40) et que le Ni pur induit un pourcentage supérieur à 5 % pour une période d'exposition de 5 jours (Figure 41).

La plupart des alliages induisent un taux de CGM inférieur à 3 %, comprenant tous les alliages métallo-céramiques, à base d'or et de palladium.

Concernant les alliages conventionnels, tous les alliages précieux blancs à base de palladium, contenant de l'Ag et du Cu, ont également un taux inférieur à 3%. Des valeurs supérieures à 3% sont retrouvées pour une brasure (GS700) à base d'or contenant la plus forte teneur en Zn (12%). Des taux supérieurs à 3% sont également retrouvés dans les alliages conventionnels à haute teneur et à teneur réduite en or : ce sont les alliages EC 830, EC 860, EC 610, EC 640 et EC 660. Tous ces alliages sont des alliages base or-argent-cuivre à l'exception de EC660 qui ne contient pas de cuivre mais du platine.

Tableau 16 : Fréquence d'apparition des Cellules Géantes Multinucléées sur une population moyenne de 800 cellules (base) sous l'action de 400µg/ml de poudre métallique (n=10).

Référence EC	Base *	Taux de CGM	E-tyt
EC 910	817	2,0%	0,7%
EC 920	749	2,2%	0,3%
EC 930 BIO	683	2,3%	0,9%
EC 940 BIO	814	1,6%	0,5%
EC 950	769	2,5%	0,5%
EC 710	792	2,3%	0,5%
EC 720	1100	1,4%	0,7%
EC 730	582	2,6%	1,0%
EC 740	652	2,8%	0,5%
EC 510	857	2,6%	0,3%
EC 520	985	1,1%	0,3%
EC 530	623	2,9%	1,0%
EC 540	637	1,7%	0,7%
EC 550	563	2,6%	0,9%
EC 820	625	2,3%	0,5%
EC 830	500	4,3%	0,5%
EC 850	798	1,6%	0,5%
EC 860 BIO	625	3,6%	0,9%
EC 610	375	4,1%	0,5%
EC 620	716	2,3%	0,6%
EC 630	1154	1,3%	0,4%
EC 640	515	3,7%	1,0%
EC 650	582	3,0%	0,8%
EC 660 BIO	511	3,8%	0,6%
EC 410	605	2,8%	0,7%
EC 420	691	1,9%	0,6%
EC 430	1099	1,1%	0,3%
EC 450	480	2,1%	0,5%
EC 460	516	2,1%	0,7%
EC 210	633	2,1%	0,5%
PV2	496	2,0%	0,6%
GP 1040	746	1,3%	0,3%
GP 1115	625	2,1%	0,5%
GP 700	263	3,2%	0,7%
GP 830	375	1,6%	0,4%
Ni	815	5,1%	1,5%
Témoin	831	1,5%	0,4%

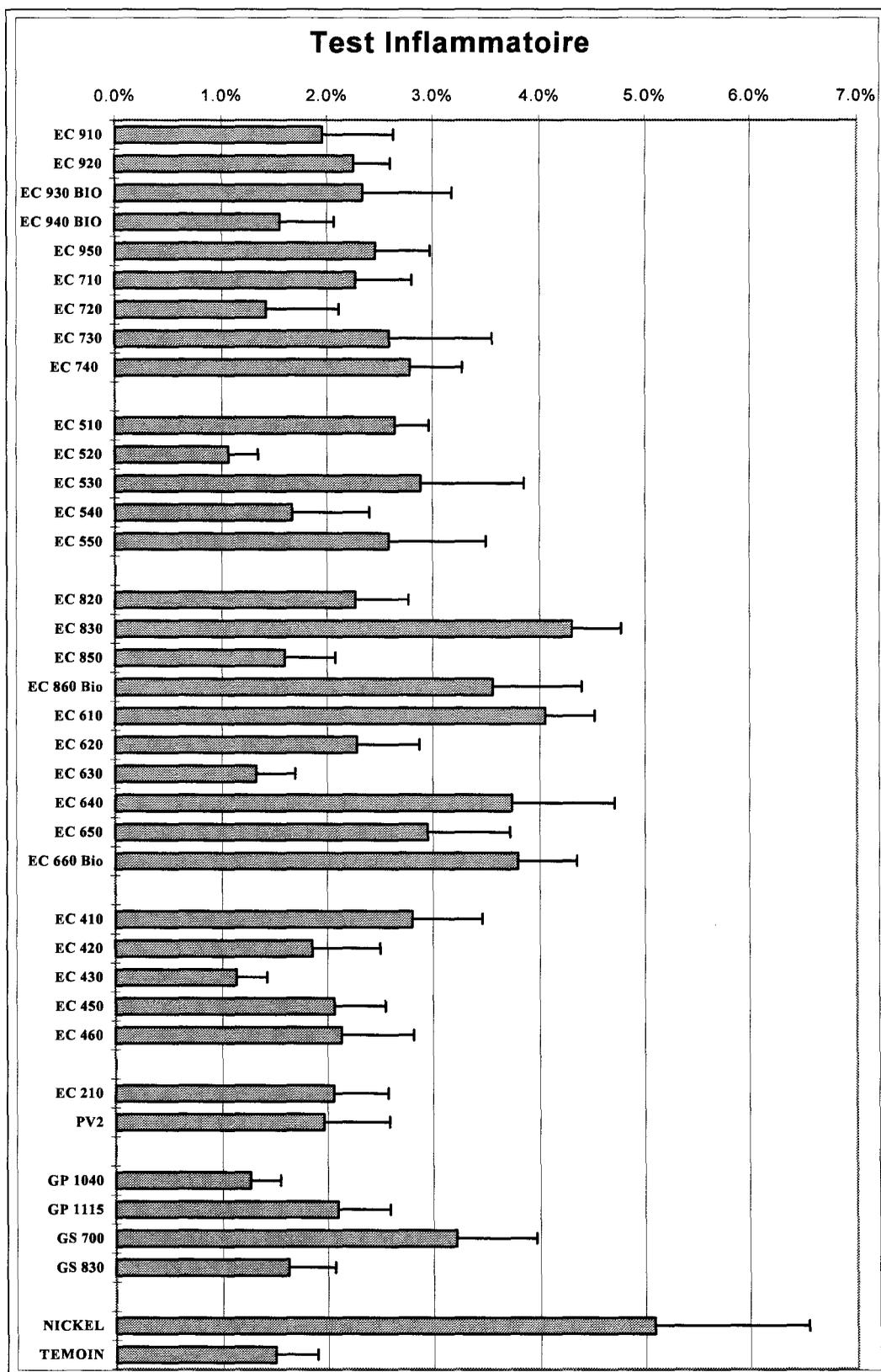


Figure 42 : Fréquence d'apparition des Cellules Géantes Multinucléées sur une population moyenne de 800 cellules (n=10).

4.2 CLASSEMENT ET CORRELATIONS

4.2.1 Classement

Afin de mieux apprécier la réponse biologique globale des alliages commerciaux, il nous a été nécessaire d'établir un barème de cotations qui permet de réunir les réponses obtenues avec les différents tests biologiques. La cotation permet d'obtenir un index pour chaque alliage ; cet index est un reflet de la réponse biologique globale de l'alliage face aux 4 tests décrits précédemment.

Les coefficients affectés à chaque test biologique en fonction de leur réponse sont reportés dans le tableau suivant (Tableau 17) . Plus l'alliage induit une cytotoxicité ou une réponse défavorable au niveau biologique, plus la cotation sera élevée.

Tableau 17 : Barème de cotation (/ 44)

Tests	Points	Total	Tests	Points	Total		
Viabilité		10	Effet inflammatoire		10		
	12 jours			5 jours			
$0\% \leq \chi < 10\%$	10		$1,0\% \leq \chi < 1,5\%$	0			
$10\% \leq \chi < 20\%$	9		$1,5\% \leq \chi < 2,0\%$	1			
$20\% \leq \chi < 30\%$	8		$2,0\% \leq \chi < 2,5\%$	2			
$30\% \leq \chi < 40\%$	7		$2,5\% \leq \chi < 3,0\%$	3			
$40\% \leq \chi < 50\%$	6		$3,0\% \leq \chi < 3,5\%$	4			
$50\% \leq \chi < 60\%$	5		$3,5\% \leq \chi < 4,0\%$	5			
$60\% \leq \chi < 70\%$	4		$4,0\% \leq \chi < 4,5\%$	6			
$70\% \leq \chi < 80\%$	3		$4,5\% \leq \chi < 5,0\%$	7			
$80\% \leq \chi < 90\%$	2		$5,0\% \leq \chi < 5,5\%$	8			
$90\% \leq \chi < 100\%$	1	$5,5\% \leq \chi < 6,0\%$	9				
$100\% \leq \chi$	0	$6,0\% \leq \chi < 6,5\%$	10				
Prolifération		20	Morphologie		4		
	3 jours		6 jours	3 jours		6 jours	
$0\% \leq \chi < 10\%$	10		10	Altérée		2	2
$10\% \leq \chi < 20\%$	9		9	Légèrement altérée		1	1
$20\% \leq \chi < 30\%$	8		8	Normale		0	0
$30\% \leq \chi < 40\%$	7		7				
$40\% \leq \chi < 50\%$	6		6				
$50\% \leq \chi < 60\%$	5		5				
$60\% \leq \chi < 70\%$	4		4				
$70\% \leq \chi < 80\%$	3		3				
$80\% \leq \chi < 90\%$	2	2					
$90\% \leq \chi < 100\%$	1	1					
$100\% \leq \chi$	0	0					

Pour la prolifération qui s'exprime en pourcentage de 0 à 100% par rapport au témoin, nous appliquons 10 points pour une valeur comprise entre 0 et 10 % et 0 point pour une valeur supérieure ou égale à 100%.

La prolifération est réalisée sur 3 jours et 6 jours. En appliquant l'échelle allant de 0 à 10 pour 3 jours et de 0 à 10 pour 6 jours nous obtenons donc un maximum de 20 points (20 étant la réponse la plus défavorable après une exposition de 3 et 6 jours) pour la prolifération.

De même la viabilité s'exprime également en pourcentage allant de 0% (toxique) à 100% (compatible), la viabilité est également affectée d'une échelle allant de 0 à 10 :

-0 si la réponse est supérieure ou égale à 100%.

-10 si elle est comprise entre 0 et 10%.

Nous obtenons donc un maximum de 10 points pour la viabilité.

Quant à l'effet inflammatoire mesuré après une exposition de 5 jours, la réponse est exprimée en pourcentage : 1,5% (de CGM) pour la culture témoin et 5 % pour le Ni qui provoque une inflammation importante. Cependant certains éléments peuvent provoquer un effet inflammatoire plus important que celui induit par le Nickel. Pour cette raison, nous choisissons d'affecter 0 point pour une réponse comprise entre 1 et 1,5%, soit aucun effet inflammatoire et 10 points pour une réponse supérieure à 6% pour un effet inflammatoire important. Nous augmentons donc de 1 point tous les 0,5%.

En ce qui concerne la morphologie cellulaire, elle est caractérisée après 3 et 6 jours de culture suivant un critère qualitatif correspondant à l'état d'altération cellulaire. Nous affectons 0 point pour une morphologie cellulaire normale, 1 point pour une morphologie cellulaire légèrement altérée et 2 points pour une morphologie cellulaire altérée, soit un maximum de 4 points pour la morphologie.

La cotation permet donc d'obtenir un total de 44 points pour une cytotoxicité maximale. Ce total de 44 est ensuite rapporté à 100 afin d'obtenir un index de cytotoxicité (I.C.) compris entre 0 et 100. Après avoir affecté un index pour chaque alliage, il nous a été possible de les classer les uns par rapport aux autres (Figure 43). Sur ce graphique, nous pouvons remarquer que la plupart des alliages ont un index compris entre 20 et 45 (ce qui correspond à une bonne tolérance par des cellules). Seuls 5 alliages ont un index supérieur à 45 : ces alliages sont dans un ordre croissant :

- GS 700 (une brasure argent-or contenant 12% de zinc)

- EC 950 (un alliage or-argent-platine contenant 7 % de Cu-Zn)

- EC 650 (un alliage conventionnel base Au-Ag-Cu)

- EC 640 (un alliage conventionnel base Au-Ag-Cu avec plus de Cu)

- GS 830 (une brasure Au-Ag-Cu contenant la plus forte quantité de cuivre de la gamme)

Ces alliages ont un index inférieur à 70. Quant au nickel pur, il obtient un index supérieur à 90.

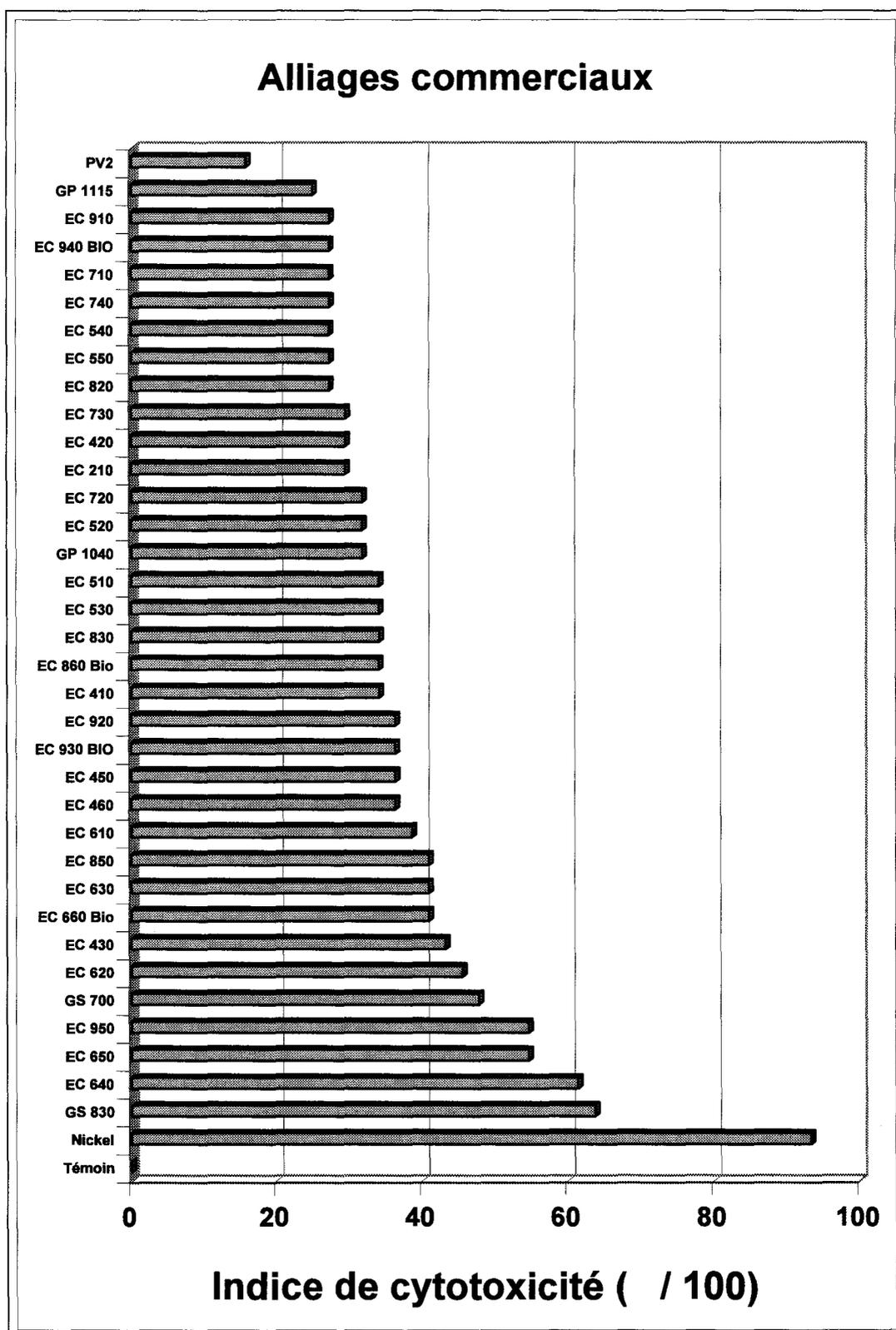


Figure 43 : Classement des alliages commerciaux par Indice de Cytotoxicité (I.C.)

Au vu des conditions très difficiles « Worth Case » imposées aux cellules de façon à pouvoir départager les alliages n'induisant pratiquement pas de cytotoxicité, nous pouvons considérer que :

- Un index inférieur à 20 apporte une parfaite cytocompatibilité.
- Un index compris entre 20 et 40 correspond à une bonne cytocompatibilité.
- Les alliages ayant un index compris entre 40 et 80 méritent une surveillance particulière.
- Un index supérieur à 80 induit une cytotoxicité trop importante pour que cet alliage puisse être utilisé.

Les alliages commerciaux sont de composition très variable, avec la présence d'éléments différents. Ceci implique des structures métallographiques diverses et il est donc très difficile d'imputer la cytotoxicité d'un alliage à un élément particulier ou à une combinaison d'éléments. Cependant, pour tenter de saisir les tendances en fonction de la composition, il est possible de représenter graphiquement l'index de cytotoxicité en fonction de la composition des alliages.

Nous pouvons remarquer (Figure 44) que l'or se retrouve de façon uniforme dans tous les alliages qu'ils soient d'index fort ou faible.

- Que l'argent est réparti assez uniformément.
- Que le palladium se retrouve plutôt dans les alliages de faible index (donc de bonne cytocompatibilité).
- Et que le cuivre se retrouve notablement plus dans les alliages d'index fort.
- Nous remarquons également que les alliages ayant les plus forts index sont des alliages Cu-Ag-Au, et que les alliages ayant les plus faibles index sont plutôt des Pd-Au et Pd-Ag.

Les Indices de Cytotoxicité obtenus sur les alliages commerciaux et leurs compositions sont résumés dans le tableau ci dessous (Tableau 18).

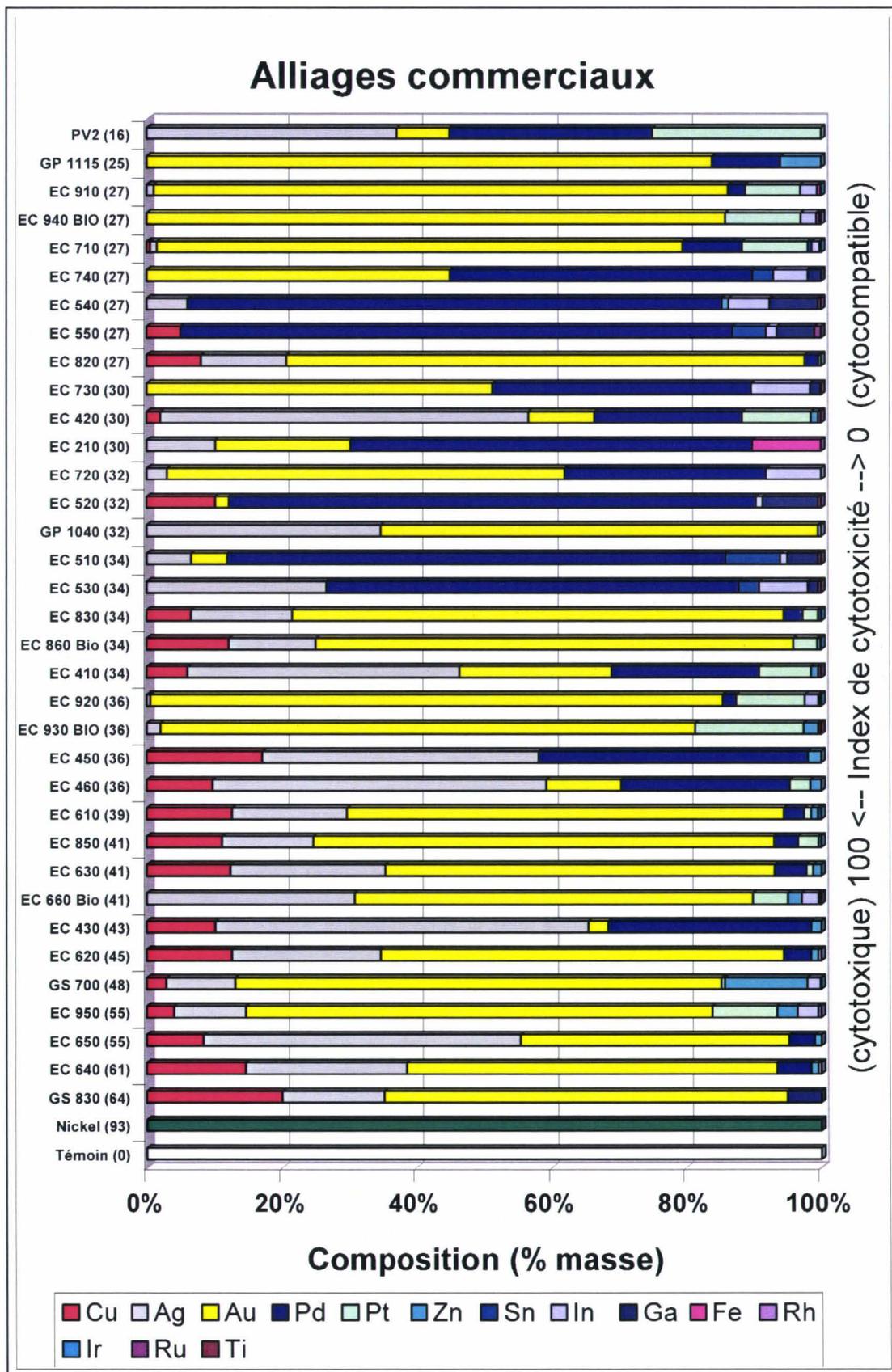


Figure 44 : Classement des alliages commerciaux selon l'Index de Cytotoxicité.

Tableau 18 : Récapitulatif de la composition et des résultats biologiques obtenus sur les alliages commerciaux de la gamme EC, établissement d'une cotation et d'un index de cytotoxicité (I.C.).

Ref. EC	Composition (ppm)														Viab.			Prolifération		Morph		Infla.		Cotation							T	I.C.
	Au	Ag	Pt	Pd	Cu	Zn	Sn	In	Ga	Fe	Rh	Ir	Ru	Ti	400µg	3 j	6 j	MEB	CGM	1	3	2	0	1	7							
PV2	80	370	250	300											91%	73%	88%	N.N.	2.0%	1	3	2	0	1	7	16						
GP 1115	840			100		60									81%	52%	90%	N.N.	2.1%	2	5	2	0	2	11	25						
EC 910	855	10	80	25			25		5		0,5				87%	55%	70%	N.N.	2.0%	2	5	4	0	1	12	27						
EC 940 BIO	860		110				23		5	2					85%	51%	66%	N.N.	1.6%	2	5	4	0	1	12	27						
EC 710	780	10	95	90	5		6	12			2				90%	47%	72%	N.N.	2.3%	1	6	3	0	2	12	27						
EC 740	451			449			30	50	20						82%	61%	76%	N.N.	2.8%	2	4	3	0	3	12	27						
EC 540		60		795		10	60	70			5				81%	56%	69%	N.N.	1.7%	2	5	4	0	1	12	27						
EC 550				820	50		50	15	55			10			91%	60%	67%	N.N.	2.6%	1	4	4	0	3	12	27						
EC 820	770	126		20	80	4									96%	43%	73%	N.N.	2.3%	1	6	3	0	2	12	27						
EC 730	512			386			86	15				1			92%	46%	73%	N.N.	2.6%	1	6	3	0	3	13	30						
EC 420	100	545	100	220	20	10						5			99%	41%	67%	N.L.A.	1.9%	1	6	4	1	1	13	30						
EC 210	200	100		600						100					88%	59%	80%	N.L.A.	2.1%	2	5	3	1	2	13	30						
EC 720	590	30		300			80								76%	44%	55%	N.N.	1.4%	3	6	5	0	0	14	32						
EC 520	20			785	100		10	80				5			83%	41%	67%	N.A.	1.1%	2	6	4	2	0	14	32						
GP 1040	650	345					5								86%	34%	52%	N.N.	1.3%	2	7	5	0	0	14	32						
EC 510	53	65		742			80	10	45			5			92%	47%	75%	N.A.	2.6%	1	6	3	2	3	15	34						
EC 530		265		615			30	70	15			5			80%	50%	73%	N.L.A.	2.9%	2	6	3	1	3	15	34						
EC 830	730	150	22	28	65		4,8					0,2			93%	52%	75%	N.N.	4.3%	1	5	3	0	6	15	34						
EC 860 Bio	709	130	35		120	5						1			85%	51%	77%	N.N.	3.6%	2	5	3	0	5	15	34						
EC 410	225	405	75	220	60	10						5			90%	47%	68%	N.L.A.	2.8%	1	6	4	1	3	15	34						
EC 920	851	5	100	20			20		2		2				88%	46%	57%	N.L.A.	2.2%	2	6	5	1	2	16	36						
EC 930 BIO	794	20	160			21						1		4	92%	47%	60%	N.A.	2.3%	1	6	5	2	2	16	36						
EC 450		410		400	170	20									82%	47%	46%	N.N.	2.1%	2	6	6	0	2	16	36						
EC 460	112	496	30	250	96	16									76%	36%	60%	N.N.	2.1%	3	7	4	0	2	16	36						
EC 610	650	170	9.8	30	125	10	5					0,2			81%	48%	70%	N.N.	4.1%	2	6	3	0	6	17	39						
EC 850	685	136	30	35	110	4									95%	29%	35%	N.L.A.	1.6%	1	8	7	1	1	18	41						
EC 630	580	230	9.8	46	122	12						0,2			74%	29%	31%	N.N.	1.3%	3	8	7	0	0	18	41						
EC 660 Bio	595	306	50			20	25			0,5	0,5		3		94%	40%	59%	N.N.	3.8%	1	7	5	0	5	18	41						
EC 430	30	555		300	100	15									55%	34%	42%	N.L.A.	1.1%	5	7	6	1	0	19	43						
EC 620	600	220		40	125	10	5								83%	35%	41%	L.A.A.	2.3%	2	7	6	3	2	20	45						
GS 700	725	100	5		29	120	20					1			37%	46%	83%	N.A.	3.2%	7	6	2	2	4	21	48						
EC 950	695	105	95		40	30	30			5					89%	27%	24%	A.A.	2.5%	2	8	8	4	2	24	55						
EC 650	400	470		37	83	10									80%	21%	4%	N.L.A.	3.0%	2	8	10	1	3	24	55						
EC 640	550	240		50	145	10	5								83%	20%	4%	N.L.A.	3.7%	2	9	10	1	5	27	61						
GS 830	600	150			200			50							50%	17%	15%	A.A.	1.6%	5	9	9	4	1	28	64						
Nickel															5%	16%	3%	A.A.	5.1%	10	9	10	4	8	41	93						
Témoin															100%	100%	100%	N.N.	1.5%	0	0	0	0	0	0	0						

4.2.2 Corrélations

Il est très difficile de pouvoir interpréter les corrélations entre l'index de cytotoxicité et un élément présent dans un alliage. Ceci s'explique par le fait que l'index de cytotoxicité représente une réponse globale de l'alliage au niveau biologique, alors que la présence d'un élément en proportion variable dans un alliage peut bien souvent être caché par le reste de la matrice. De plus dans notre cas où nous utilisons des alliages déjà commercialisés la matrice est inévitablement différente lorsque nous essayons de suivre l'évolution de l'indice en fonction de la concentration d'un élément de l'alliage. Dans ces conditions il n'est pas possible d'établir une corrélation directe entre un élément de l'alliage et l'index de cytotoxicité. Cependant le nombre important de 36 alliages testés biologiquement dans les mêmes conditions nous permet d'établir certaines tendances. Pour essayer de chiffrer ces tendances nous effectuons un calcul simple de régression linéaire. Pour ce faire nous utiliserons le coefficient de détermination R^2 . Les alliages pris en compte pour le calcul possèdent une fraction de l'élément étudié, nous éliminons les alliages ne possédant pas cet élément, le métal pur est également écarté du calcul.

Le palladium (Figure 45) ne présente pas de tendance très significative avec $R^2=0,12$. Cependant sa présence en quantité croissante semble plutôt bénéfique pour l'alliage. Le cuivre (Figure 46) quant à lui a une tendance plus marquée avec $R^2=0,21$ avec un effet inverse, sa présence dans l'alliage ne semble pas être un facteur bénéfique au niveau de l'index de cytotoxicité. L'argent (Figure 47) et l'or (Figure 48) ne semblent avoir aucun impact sur l'index de cytotoxicité avec des coefficients inférieurs à 0,01. En revanche le platine, lorsque il est présent (Figure 49) témoigne d'une amélioration de l'alliage avec $R^2=0,35$.

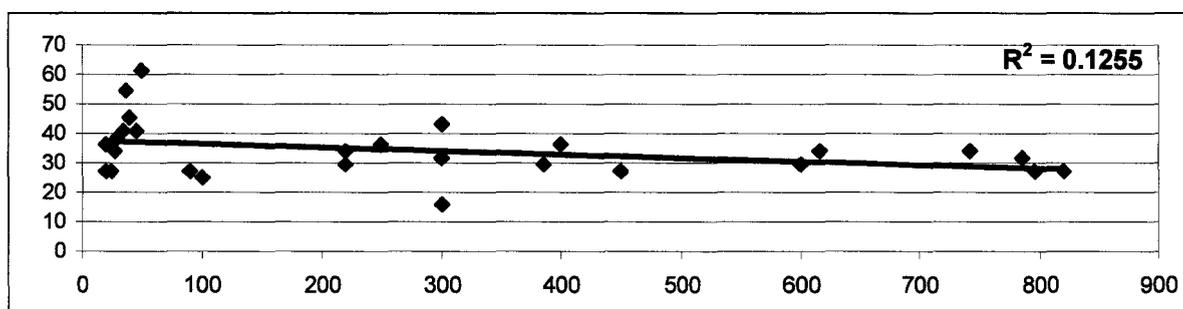


Figure 45 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Pd (en %).

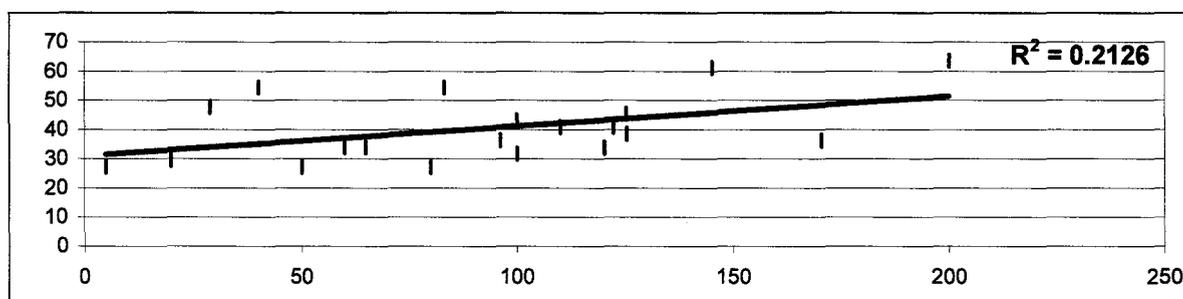


Figure 46 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Cu (en %).

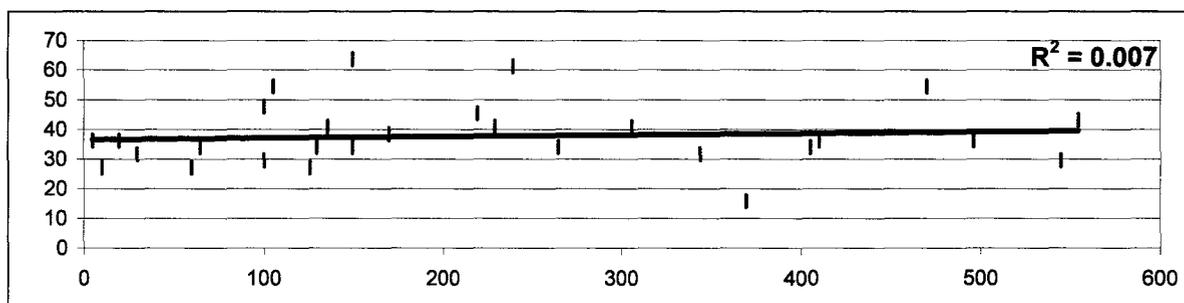


Figure 47 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Ag(en %).

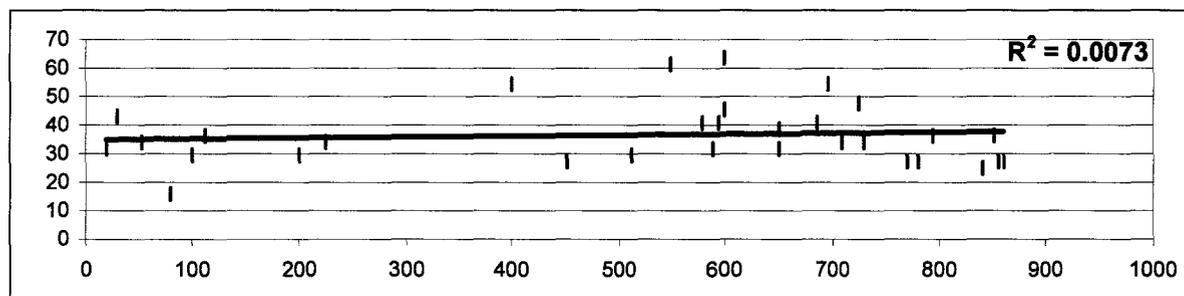


Figure 48 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Au (en %).

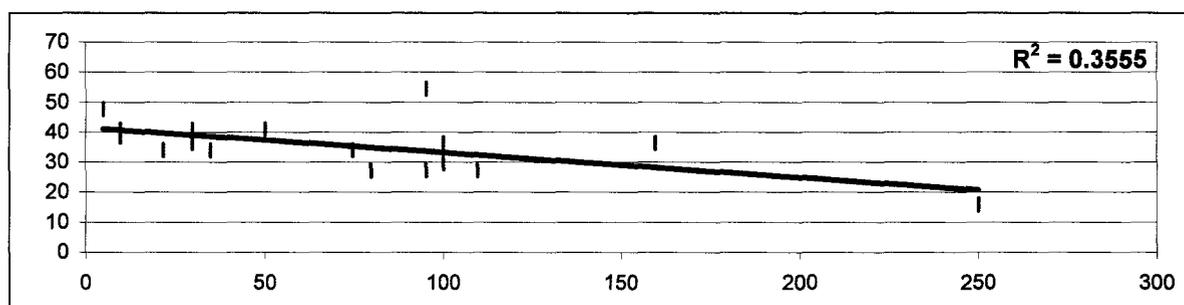


Figure 49 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Pt (en %).

4.3 CONCLUSION

L'étude biologique des alliages commerciaux nous a donc permis de vérifier leur bonne cytocompatibilité et d'établir un Index de Cytotoxicité. Le classement des alliages par l'intermédiaire de cet index nous a révélé que les alliages de palladium faisaient généralement partie des meilleurs alliages. Nous avons également remarqué que les alliages les moins cytocompatibles contenaient généralement du cuivre. Cependant il n'a pas été possible d'établir une relation de corrélation entre l'index de cytotoxicité et la composition des alliages, ceux-ci étant de composition trop variable.

**5 ETUDE DES ALLIAGES
EXPERIMENTAUX
(Pd-Cu-Ag-Au)**

5.1 CARACTERISATION PHYSIQUE

5.1.1 Etude de la microstructure

5.1.1.1 Echantillonnage et polissage préparatoire

Pour chaque alliage expérimental, une pastille est choisie au hasard. Après chaque découpe les pastilles ont un diamètre de 15 mm et 2 mm d'épaisseur. L'une des faces est poinçonnée avec les caractéristiques de l'alliage, l'autre face est plane et rugueuse. Ensuite nous effectuons un polissage préparatoire des échantillons sur une série de papiers abrasifs en SiC allant du grade 800 au grade 4000, les grains d'abrasif étant de plus en plus fins. Ce polissage s'effectue de façon mécanique, ce qui consiste à fixer le papier de polissage en forme de feuilles rondes sur un disque tournant, et à exercer une légère pression sur l'échantillon au contact du disque. Le polissage s'effectue sous un jet d'eau continue de façon à éviter les échauffements limitant ainsi l'écrouissage. En passant d'un papier au suivant, nous tournons l'échantillon de 90° afin de pouvoir observer la disparition totale des traces du polissage sur le papier précédent.

Le polissage mécanique de l'échantillon s'achève par un polissage final ou «finition». Le polissage de finition est exécuté en deux étapes, la première avec une pâte diamantée de 3µm puis avec une pâte diamantée de 1µm sur disque imbibé d'un lubrifiant organique. Une fois le poli spéculaire obtenu les échantillons sont dégraissés à l'alcool puis séchés à l'air sous pression.

Sur une surface polie, il est parfois possible de distinguer certains constituants sans attaque préalable, soit à l'œil nu, soit au microscope. Cette différenciation des constituants peut être due soit au pouvoir réflecteur, soit à la couleur ou à la dénivellation due à la différence de dureté des cristaux. Certains défauts comme les porosités et les fissures sont visibles sans attaque.

5.1.1.2 Attaque

Pour la différenciation et l'identification des différents constituants, nous préférons attaquer l'échantillon avant de l'examiner. Les métaux possèdent normalement une structure polycristallin. En plus des dislocations et des défauts ponctuels, les surfaces sont alors intersectées par des joints de grains délimitant les cristaux de différentes orientations. La faible stabilité de ces sites caractérisés par une énergie plus élevée, favorise une attaque chimique locale [59], un phénomène utilisé en métallographie pour mettre en évidence les joints de grains. De même, la dissolution anodique dans certains cas fait ressortir la microstructure de la surface d'un métal polycristallin. La différenciation est basée sur au moins l'un des effets suivants [27] :

- *la dissolution superficielle* : la solubilité des différents constituants dans les réactifs spécifiques n'étant pas la même, l'attaque plus ou moins profonde affecte le degré de polissage, donc aussi le pouvoir réflecteur, ce qui donne une teinte plus ou moins

foncée aux cristaux et agrégats plus ou moins complexes. Leur identification est rendue possible par l'emploi de réactifs spécifiques.

- *la coloration* : la réaction chimique peut former sur la surface d'un constituant déterminé un film transparent très mince. La coloration apparente (phénomène d'interférence optique) est fonction notamment de l'épaisseur du film.

- *le dépôt d'un précipité* : le réactif peut provoquer une précipitation sur un constituant déterminé ; par exemple les sulfures alcalins dissous forment des sulfures insolubles avec un grand nombre de métaux.

Mais l'attaque ne permet pas seulement de distinguer entre eux les différents constituants. Dans un alliage ne présentant qu'une seule phase, la structure peut être rendue visible par l'attaque des joints de grains ou de la surface des grains. Les deux effets sont dus à la dissolution superficielle par réaction chimique. L'attaque obscurcit en général les limites des grains car la solubilité est plus grande à l'interface des différents grains. L'hétérogénéité en est la principale cause.

Il ressort que l'on emploie le plus souvent des réactifs appropriés à chaque type d'alliage. Dans notre cas nous recherchons des contrastes prononcés en vue de l'examen macrographique et micrographique. Les alliages étant à base de palladium et d'argent nous choisissons une attaque acide par HNO_3 concentré qui provoque un relief sélectif des différentes phases.

Sur chaque pastille poli miroir nous déposons une goutte d'acide nitrique concentré (N.P.) pendant 10 secondes à 25°C . Le ternissement apparaît, puis nous rinçons immédiatement à l'eau distillée. Le traitement se poursuit par un nettoyage à l'alcool éthylique suivi d'un séchage à l'air comprimé. Les échantillons sont alors prêts pour l'observation.

Puisque l'attaque est fonction de la composition chimique, une figure d'attaque peut donner des renseignements sur l'ampleur de la ségrégation qui correspond à l'image de la cristallisation primaire de l'alliage, la forme des dendrites et leur ségrégation de composition apparaît donc à ce moment.

Pour prendre les clichés de la microstructure, les échantillons métalliques étant opaques, nous utilisons un microscope métallographique avec équipement de micrographie. L'analyse se fait par réflexion. Notons l'importance de l'éclairage qui doit être adapté en incidence et en intensité en fonction de l'intensité de l'attaque (Microscope Reichert-Jung X200).

5.1.1.3 Etude des alliages expérimentaux.

D'après leur micrographie les alliages peuvent se répartir en trois classes. Les alliages palladium - argent, les palladium - cuivre et les palladium - cuivre - argent. Nous tenterons d'expliquer l'impact que peut avoir l'addition d'or dans ces alliages (Figure 50).

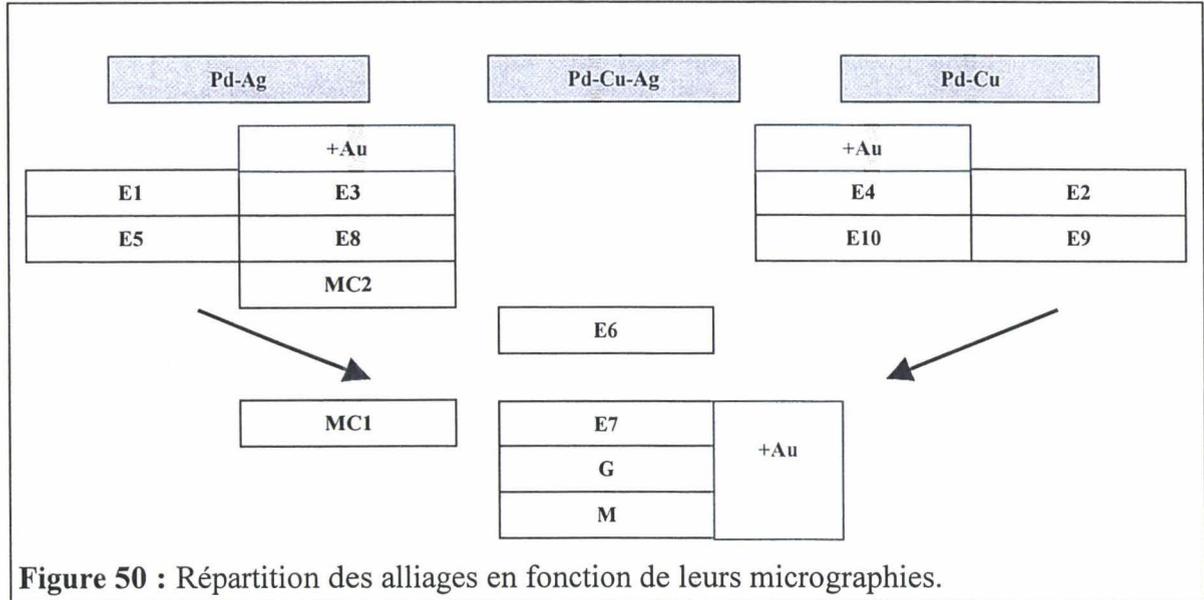


Figure 50 : Répartition des alliages en fonction de leurs micrographies.

5.1.1.3.1 Les alliages Pd-Ag.

L'alliage E1(20% Ag) semble avoir subi une attaque importante, l'apparition des dendrites est visible et fortement marquée, les crevasses semblent profondes et bien marquées (Figure 51). Par addition d'argent, l'alliage (E5-40% Ag) voit apparaître des dendrites larges et moins contrastées avec un effet de flou comme si la diffusion avait été plus importante (Figure 52).

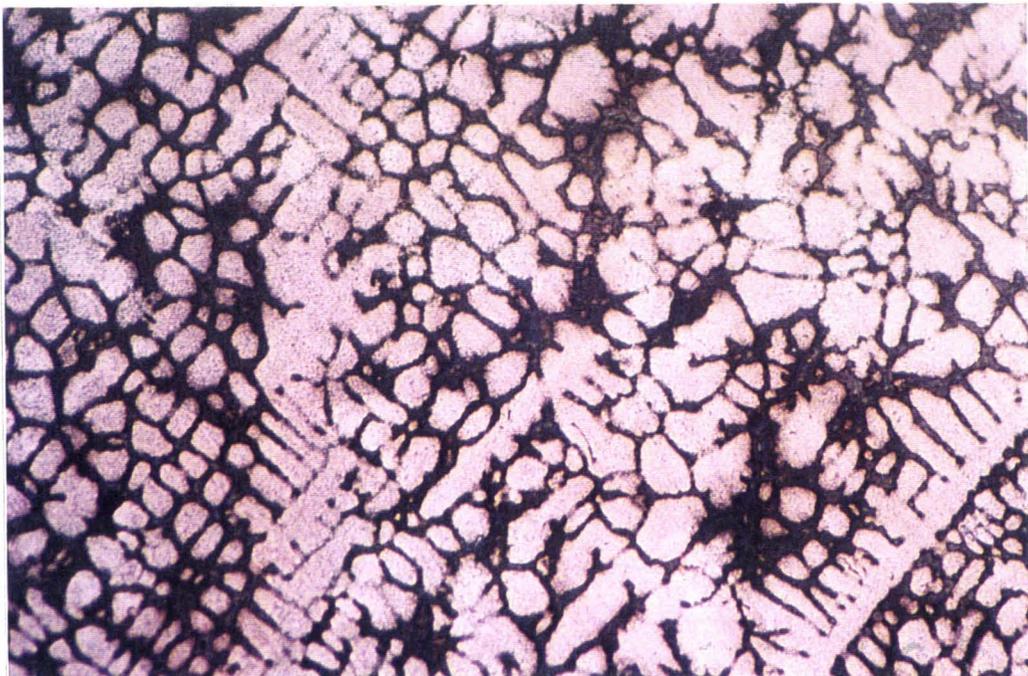


Figure 51 : Micrographie de l'alliage E1 (X200).

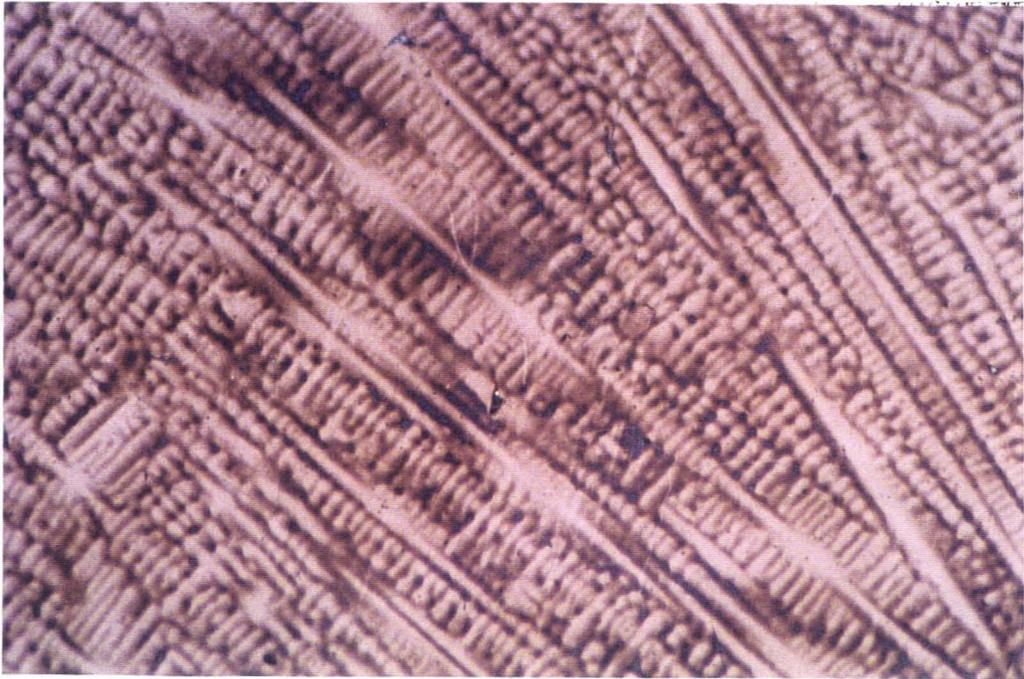


Figure 52 : Micrographie de l'alliage E5 (X200).

Dans ce type d'alliage, l'impact de l'or semble notable, en passant de l'alliage E1 à l'alliage E3 (10% Ag, 10% Au) par une substitution de 10% d'or à l'argent. Les dendrites provoquées par l'argent sont alors bien moins marquées, donc plus homogènes et moins sensibles à la corrosion. Cependant les joints de grains apparaissent plus visiblement et ont donc probablement plus de défauts. On peut noter également des colorations différentes entre les différents grains ce qui révèle les joints de grains (**Figure 53**).

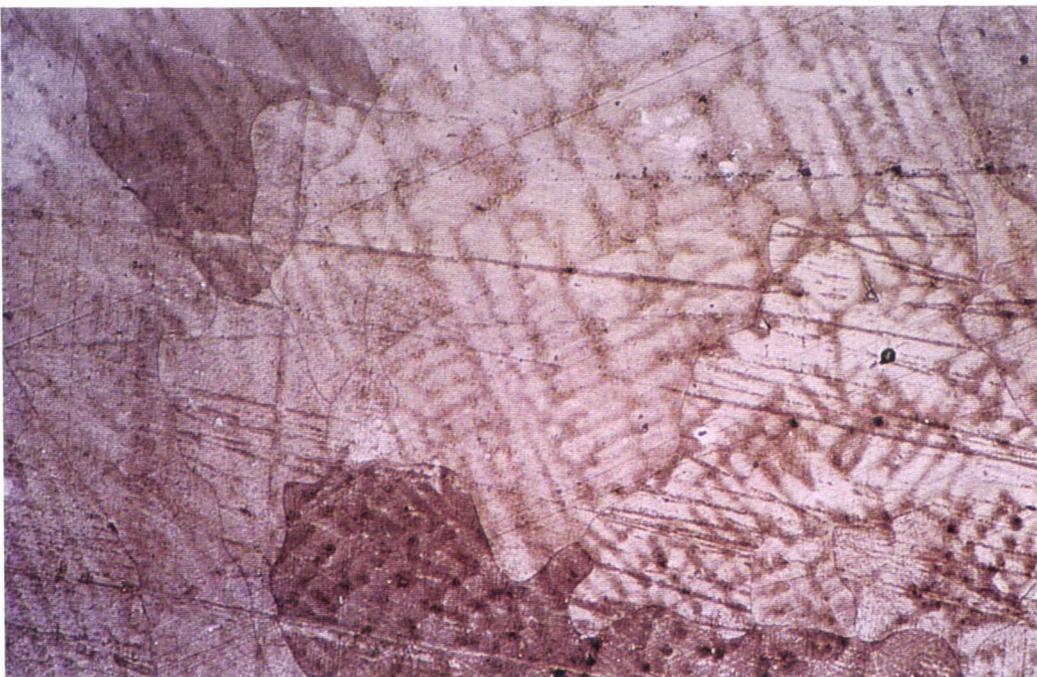


Figure 53 : Micrographie de l'alliage E3 (X200).

Ce même impact de l'or se retrouve dans l'alliage E8 (30% Ag, 10% Au) où on a substitué 10% d'or à l'argent de l'alliage E5. Dans ce cas les dendrites sont toujours visibles mais l'impression de longues dendrites floues fait place à une surface colorée par diffraction, ce qui semble indiquer une redéposition à la surface du métal. L'alliage semble avoir été faiblement attaqué. Il présente une surface peu creusée. L'attaque semble avoir été uniforme avec apparition de zones blanches, riches en argent (Figure 54).

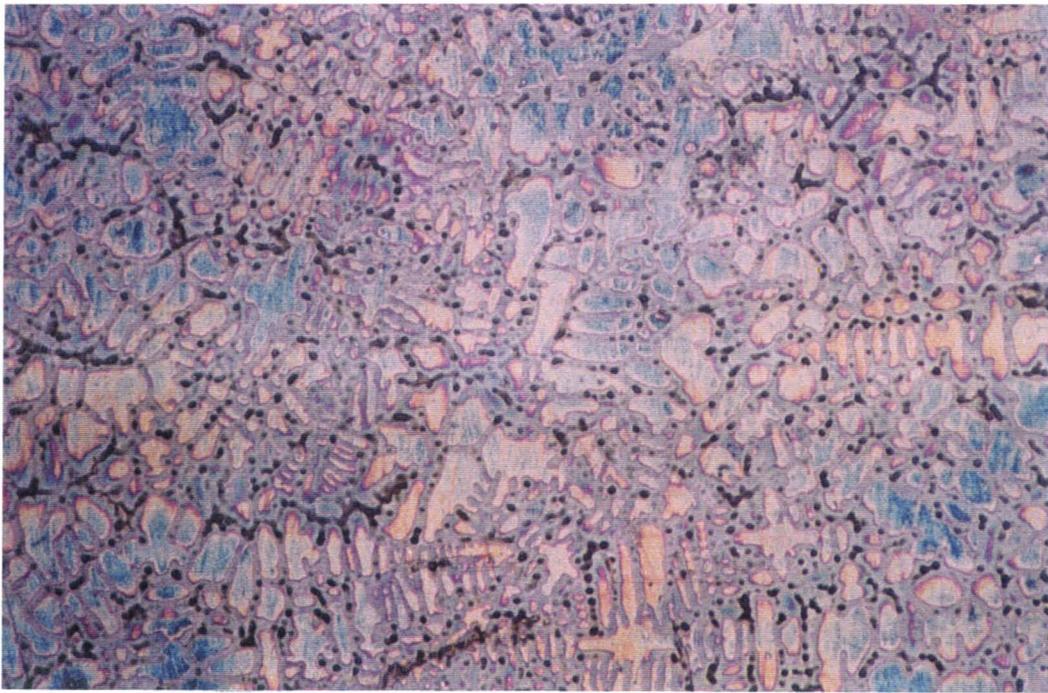


Figure 54 : Micrographie de l'alliage E8 (X200).

Une quantité importante de 40% d'argent dans le palladium ne semble pas être un facteur néfaste pour l'alliage. D'autre part, l'addition d'or dans ces alliages semble être un facteur favorable permettant une meilleure diffusion des éléments entre eux et limitant apparemment la corrosion.

Une addition de In et Sn nécessaire à l'accroche céramique dans l'alliage E8 au dépend de Au et Ag permet d'obtenir l'alliage MC2. La structure de MC2 est très proche de celle de E8 avec cependant disparition de la redéposition. L'attaque semble avoir été douce, les dendrites sont moyennes et ressemblent à une structure biphasée d'un alliage stable comme avec un recuit (Figure 56). Par contre, si on additionne seulement In à l'alliage E8, on obtient l'alliage MC1 où les dendrites sont faibles, fines et assez marquées (Figure 55).

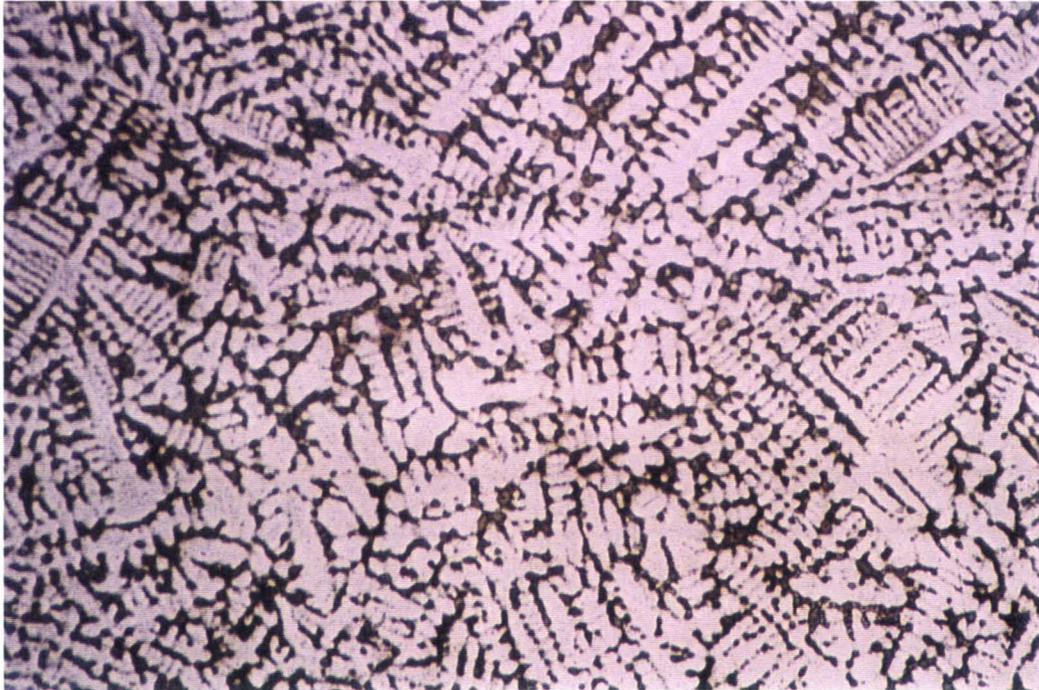


Figure 55 : Micrographie de l'alliage MC1 (X200).

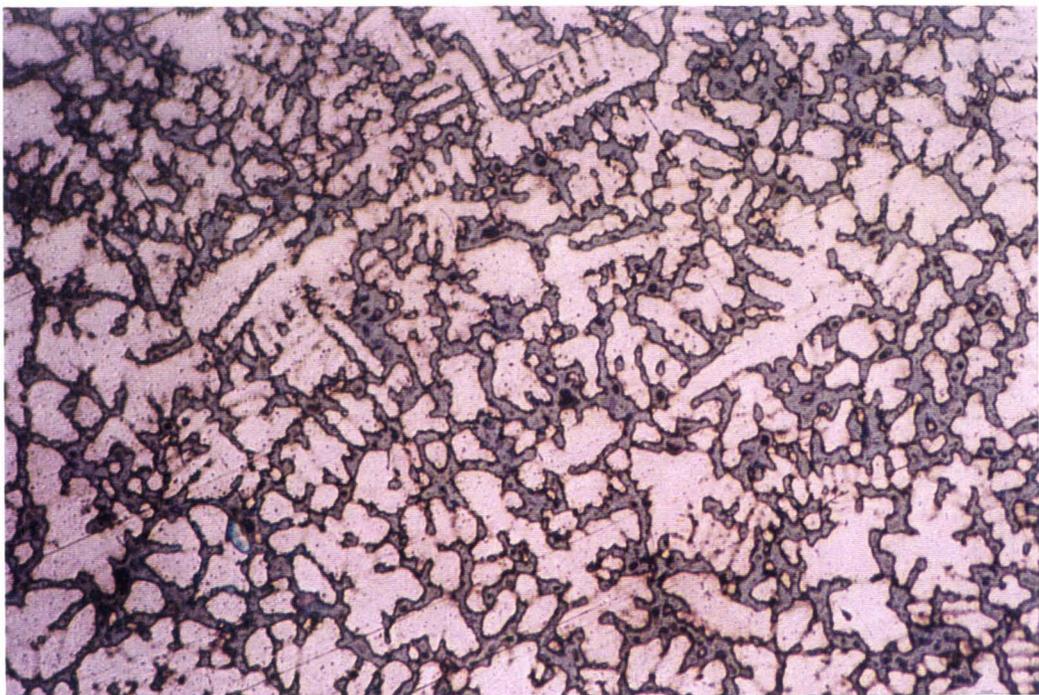


Figure 56 : Micrographie de l'alliage MC2 (X200).

5.1.1.3.2 Les alliages Pd-Cu.

L'alliage E2 (20% Cu) possède une structure à joints de grains très marqués. Il n'est pas possible de donner un indice de grain. On repère la structure basaltique de l'alliage. Il apparaît également une sous structure dendritique très faible à l'intérieur des grains (Figure 57). Une addition de cuivre dans l'alliage E2 permet d'obtenir l'alliage E9 (25% Cu). La structure ne semble pas avoir changé mais la sous structure dendritique semble avoir disparu (Figure 58).



Figure 57 : Micrographie de l'alliage E2 (X200).

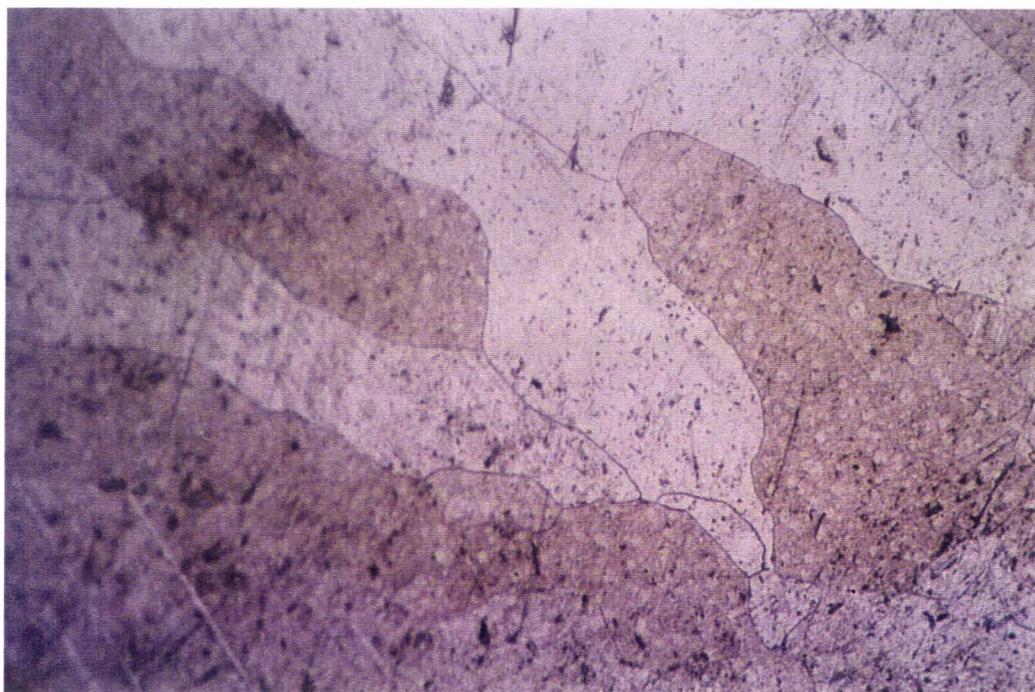


Figure 58 : Micrographie de l'alliage E9 (X200).

En l'absence d'or, l'addition de cuivre au palladium ne semble pas affecter la cristallisation. Elle semble même éliminer la sous structure dendritique.

Nous remarquons l'impact de l'or dans ces alliages par une substitution de 10% d'or au cuivre se trouvant dans E2 pour obtenir l'alliage E4 (10% Cu, 10% Au). On constate l'apparition importante d'une structure dendritique très fine due au cuivre qui fusionne avec l'or et ne se retrouve donc pas dans le palladium. Les dendrites sont provoquées par les zones riches en Au-Cu (Figure 59).

De la même façon, l'alliage E10 (25% Cu 10% Au) est obtenu à partir de l'alliage E9 par substitution de 10% d'or au palladium. La structure dendritique est encore plus marquée avec des dendrites plus larges (Figure 60).



Figure 59 : Micrographie de l'alliage E4 (X200).

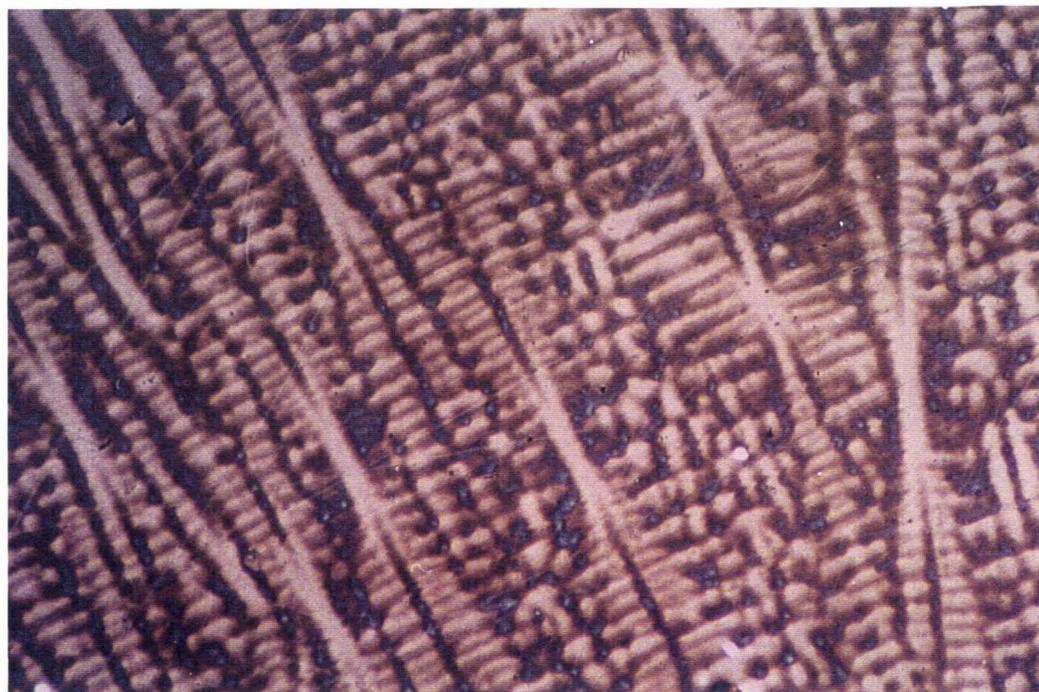


Figure 60 : Micrographie de l'alliage E10 (X200).

L'addition d'or dans ces alliages provoque donc l'apparition d'une structure dendritique d'autant plus marquée que la quantité en cuivre est importante.

5.1.1.3.3 Les alliages Pd-Cu-Ag.

Les alliages E6, E7, G et M ont une structure dendritique fine très marquée témoignant d'une corrosion importante. L'addition d'or semble n'avoir aucun impact sur la structure. Cependant l'alliage M fait apparaître une structure dendritique plus courte et sans orientation. Cet alliage semble avoir subi une solidification rapide.

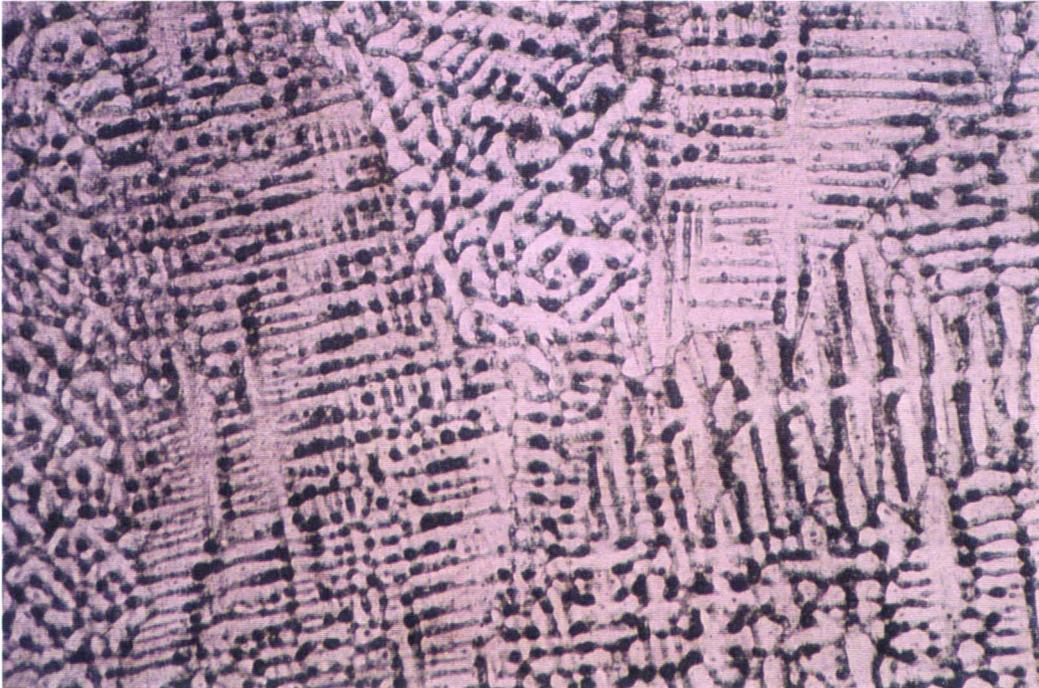


Figure 61: Micrographie de l'alliage E6 (X200).

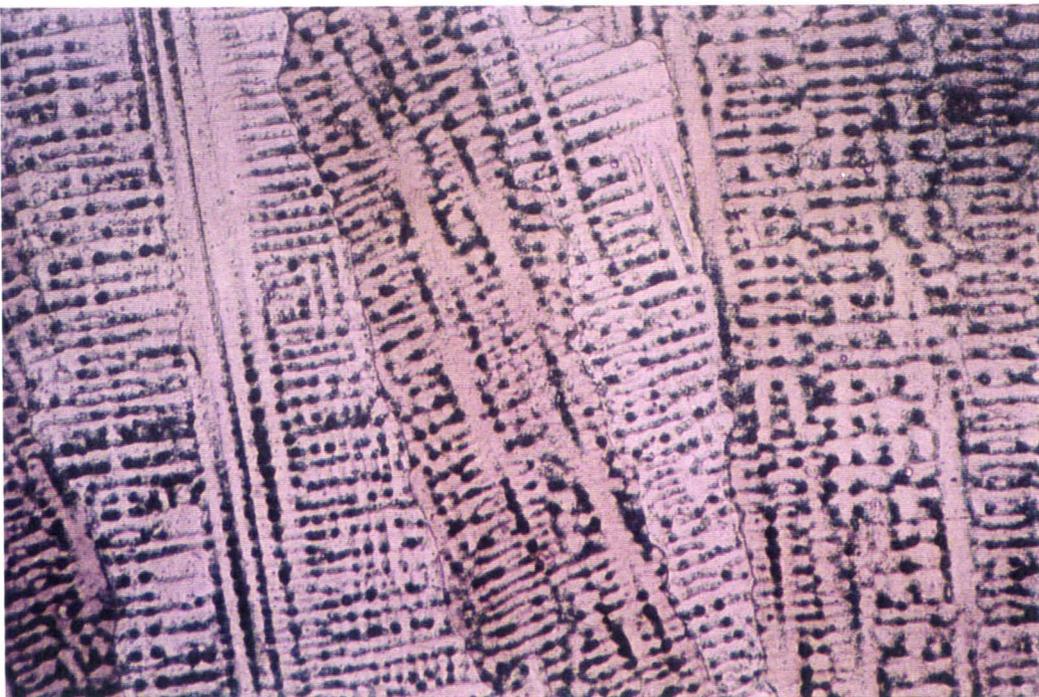


Figure 62: Micrographie de l'alliage E7 (X200).

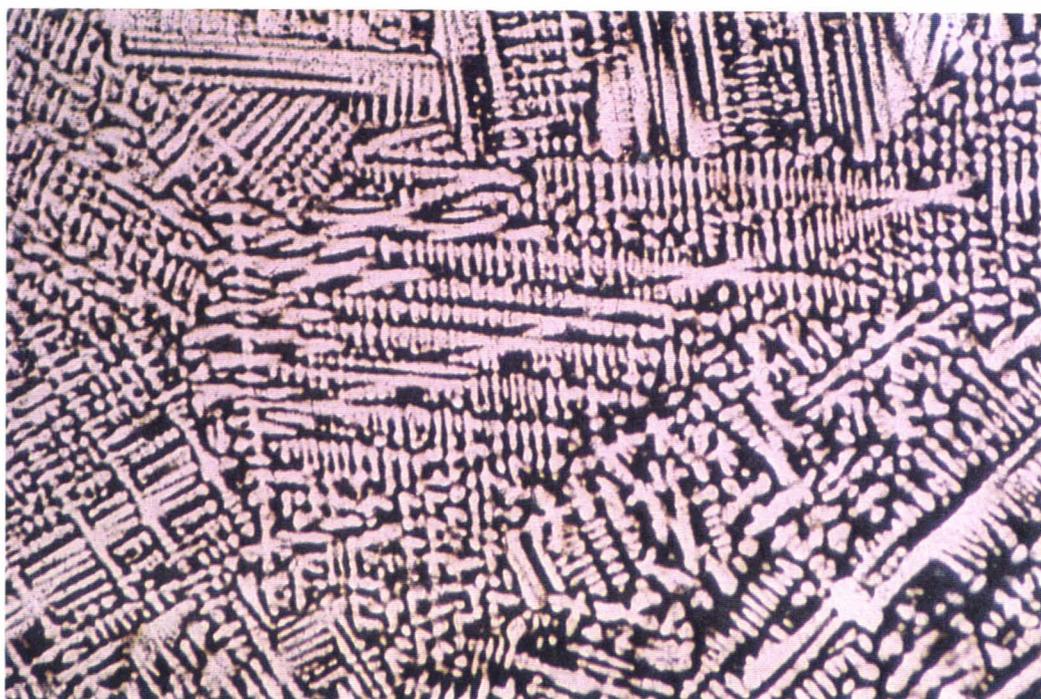


Figure 63: Micrographie de l'alliage G (X200).

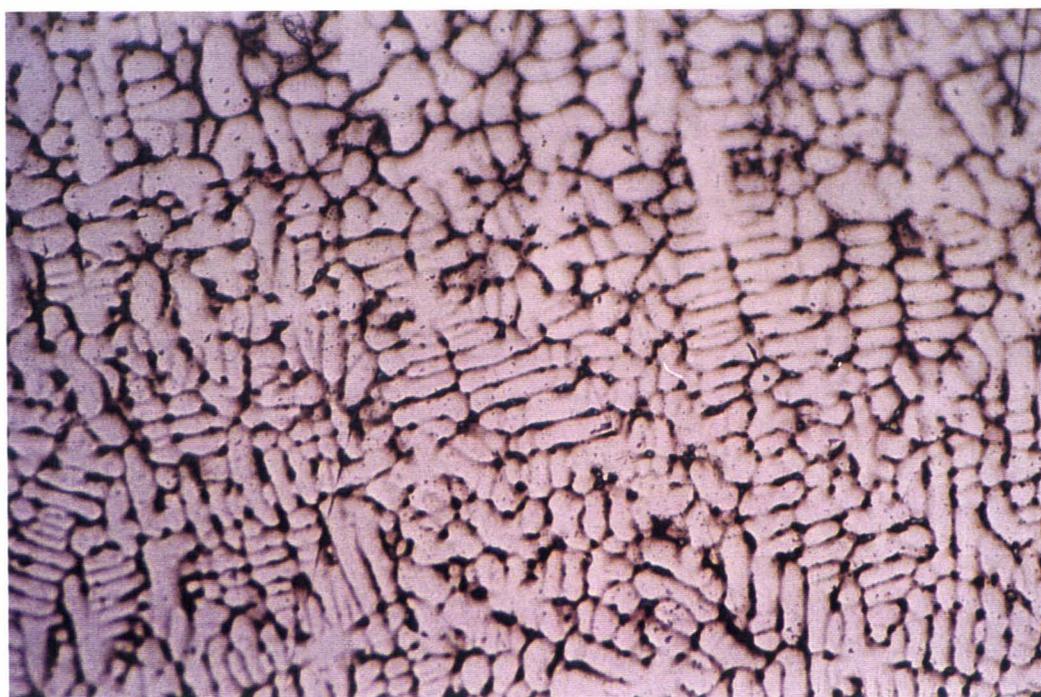


Figure 64: Micrographie de l'alliage M (X200).

5.1.2 Dureté

La dureté est une mesure de la résistance à la déformation plastique. Elle s'exprime en unité conventionnelle :

HB = dureté Brindell

HRC = dureté Rockwell-c.

VPN = dureté Vickers (Vickers Piramidal Number).

C'est cette dernière unité (VPN) que nous utiliserons pour notre étude. La dureté Vickers s'obtient à partir de l'empreinte laissée par une pointe de diamant appliquée contre l'échantillon. La pointe a la forme d'une pyramide à base carrée. La charge appliquée est de 5 kg pendant 10s. Nous obtenons la dureté à partir de la mesure des diagonales de l'empreinte carrée laissée sur l'échantillon (ISO 6507). Une petite empreinte indique une dureté importante.

Pour obtenir une valeur représentative de la dureté de l'alliage, nous utilisons 3 pastilles par barreau, provenant respectivement du haut, du milieu et du bas du barreau métallique. Une fois les trois pastilles sélectionnées, 6 prises de dureté sont effectuées suivant un rayon de la pastille, partant du centre vers l'extérieur (Figure 66). La dureté des différents alliages utilisés est reportée ci contre (Tableau 19).

Nous constatons qu'il n'y a pas de différence notable entre les trois pastilles prélevées à différents niveaux du barreau. Par contre il y a pour la plupart des alliages une légère évolution de la dureté du centre de la pastille vers l'extérieur (Figure 65).

Tableau 19 : Dureté Vickers des alliages expérimentaux.

Alliage	VPN	SD
Pd	47,4	1.1
Cu	55.0	2.4
Ag	34.0	3.1
E1	81.6	10.2
E2	110.4	7.3
E3	86.0	2.2
E4	102.0	3.9
E5	80.6	12.4
E6	145.7	13.9
E7	141.6	7.8
E8	85.4	7.6
E9	120.3	4.2
E10	131.4	4.3
G	129.0	5.8
M	129.6	3.0
MC1	105.6	2.5
MC2	112.3	3.0
Ni	74.5	2.4

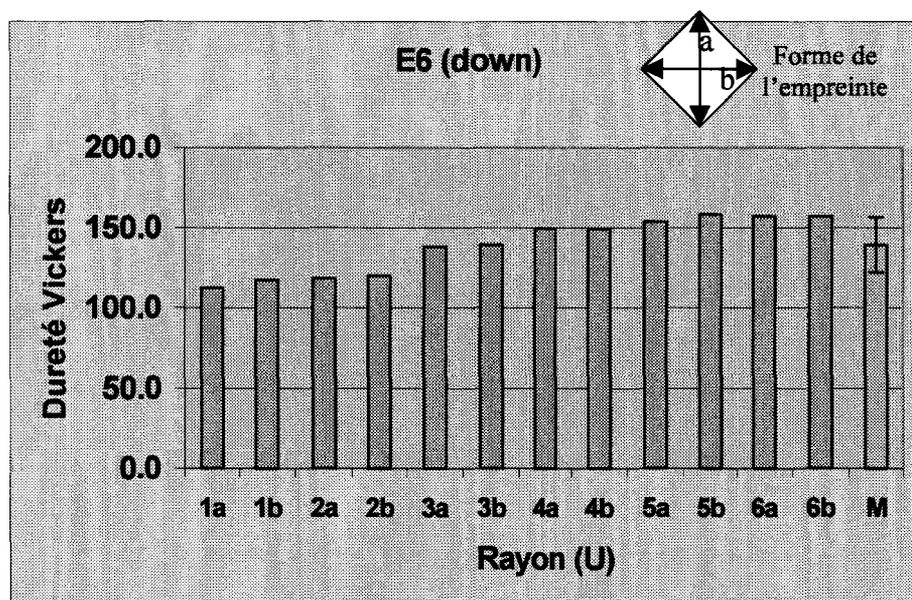


Figure 65 : Evolution de la dureté Vickers en fonction du rayon de la pastille (La dureté augmente du centre vers la périphérie).

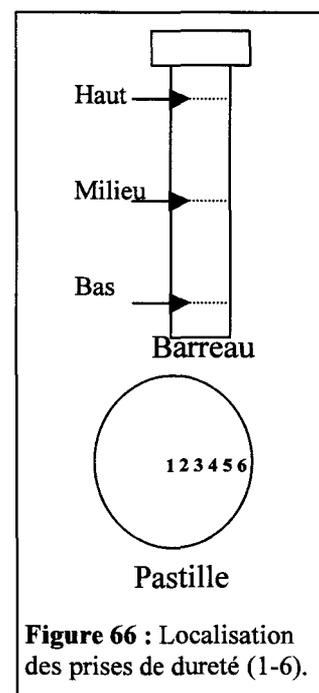


Figure 66 : Localisation des prises de dureté (1-6).

La dureté est un paramètre différent qui nous permet de vérifier si la méthode artisanale de coulée utilisée ainsi que les vitesses de refroidissement qui en découlent, aboutissent bien à une structure (voir p74) et une dureté équivalente aux alliages commercialisés par l'entreprise. La comparaison de quatre de ces alliages est représentée ci dessous (Figure 67). Nous constatons que les alliages élaborés artisanalement ont des structures et des duretés équivalentes aux alliages commercialisés, ceci avant ou après cuisson céramique.

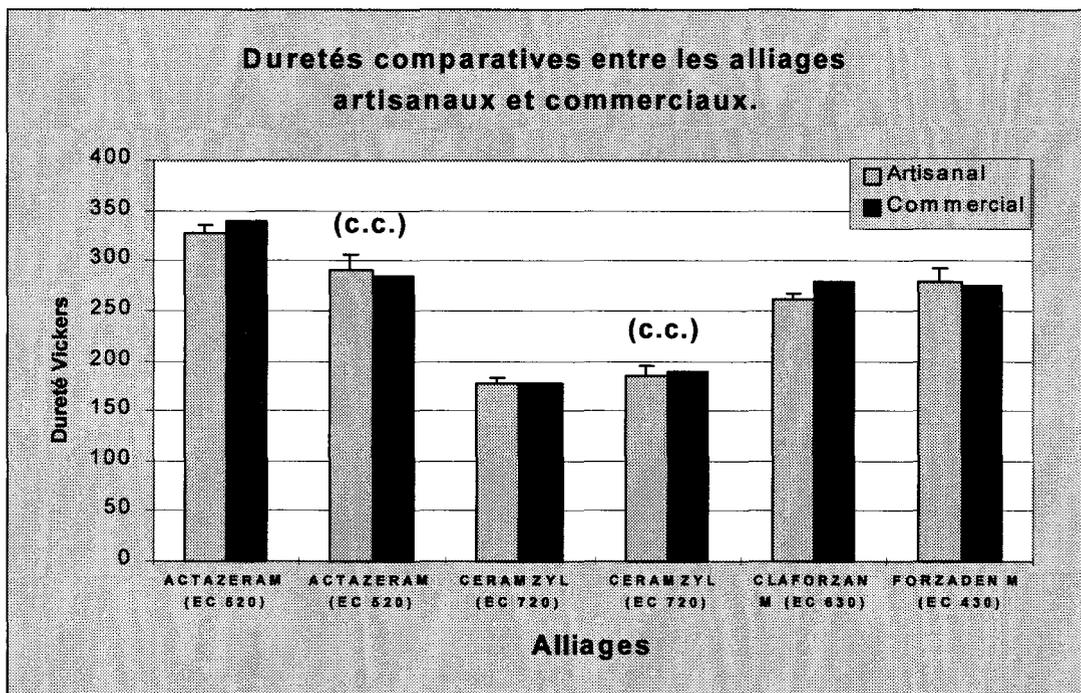


Figure 67 : Duretés comparatives entre les alliages commercialisés et les alliages obtenus avec la méthode de préparation artisanale (c.c. : cuisson céramique).

5.2 MESURES ELECTROCHIMIQUES

Les alliages à base de palladium sont additionnés d'or d'argent et de cuivre pour diverses raisons décrites précédemment (§ 2.2), ces additions permettent également de limiter le chargement du palladium en gaz et particulièrement en hydrogène [99].

5.2.1 Essais électrochimiques

Ces essais utilisent le bioréacteur et le réacteur 10 mesures décrit précédemment. Ces tests ont pour but de différencier les alliages base palladium quant au risque de corrosion.

Le tracé des courbes intensité potentiel et la mesure des potentiels d'abandon sont effectués à l'aide des montages décrits précédemment. Nous avons étudié les différents alliages expérimentaux dont la composition est reportée dans le Tableau 11. La surface utile des échantillons est de $0,5\text{cm}^2$, la température de l'électrolyte est de 37°C .

Comme indiqué au § 3.2.2 les essais sont effectués en milieu NaCl 0,9% pour étudier l'action de l'anion Cl^- et permettre une interprétation simple. Les essais effectués en salive artificielle permettent de se rapprocher des conditions physiologiques. Pour les courbes intensité potentiel deux techniques sont employées. Une appelée polarisation globale avec un balayage en potentiel de -1200mV à $+1200\text{mV}$ / Ag/AgCl. Cette polarisation se compose d'une partie cathodique qui décape l'échantillon et réduit les oxydes des surface, et d'une partie anodique où nous pouvons alors étudier l'alliage exempt de film. L'autre technique est le tracé de la courbe anodique seule qui permet d'étudier le film formé *ex situ* sur l'échantillon. Enfin une étude de l'évolution du potentiel en fonction du temps a été menée.

5.2.1.1 Polarisation globale

Dans un premier temps, les manipulations sont réalisées dans une solution de NaCl à 0,9%. Cette solution est souvent utilisée dans les laboratoires car elle est facile à mettre en œuvre et correspond à un milieu physiologique pour les cellules.

Les alliages testés sont à base de palladium et contiennent de l'or en proportions différentes. Pour des raisons de coûts de matière, les fabricants de prothèses dentaires désirent ajouter de l'argent au palladium. L'argent a l'avantage d'être moins cher, mais il est également moins résistant à la corrosion. Le cuivre est ajouté aux alliages base palladium pour augmenter la dureté du matériau, il est aussi moins résistant à la corrosion. C'est pourquoi plusieurs compositions d'alliages base palladium, contenant de l'argent, du cuivre et de l'or ont été déterminées par un plan d'expérience, puis testées par des mesures électrochimiques.

5.2.1.2 Polarisation globale dans la salive artificielle

Le milieu salivaire est une composition plus proche de la réalité que le NaCl à 0,9%. De plus, ce milieu est tamponné.

En comparaison avec les résultats obtenus dans le NaCl, la salive artificielle semble moins agressive pour les alliages. En effet, les intensités des pics sont plus importantes dans le NaCl à 0,9% que dans la salive artificielle. Les polarisations cycliques mettent en évidence la faculté de se passiver d'un alliage au cours des différents cycles. Pour les cycles réalisés dans la salive artificielle, l'intensité des pics n'évolue pas. Au contraire, pour les essais menés dans le NaCl, les pics augmentent d'intensité, ce qui montre que les alliages ne peuvent pas se passiver dans ce milieu (Figure 68). Pour l'argent, les pics de corrosion sont moins importants dans le milieu salivaire. Pour un courant de $200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ dans le NaCl, nous obtenons un courant de $30 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ dans la salive.

De plus, la salive semble décaler vers les potentiels négatifs le pic de réduction de l'argent. Ainsi il semble qu'un film plus stable se crée en surface de l'alliage trempé dans la salive.

Dans le NaCl, ce film est formé de AgCl et il se détruit rapidement quand l'alliage atteint le potentiel retour du pic de corrosion de l'argent. Alors que dans la salive, il faut descendre encore en potentiel pour obtenir cette rupture du film. Ceci s'explique par la différence de composition du film de AgCl en surface qui est renforcé par tous les éléments chimiques entrant dans la composition de la salive.

La salive artificielle est plus proche des conditions réelles que le NaCl à 0,9%. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre la sensibilité à la corrosion des alliages et leur réponse biologique.

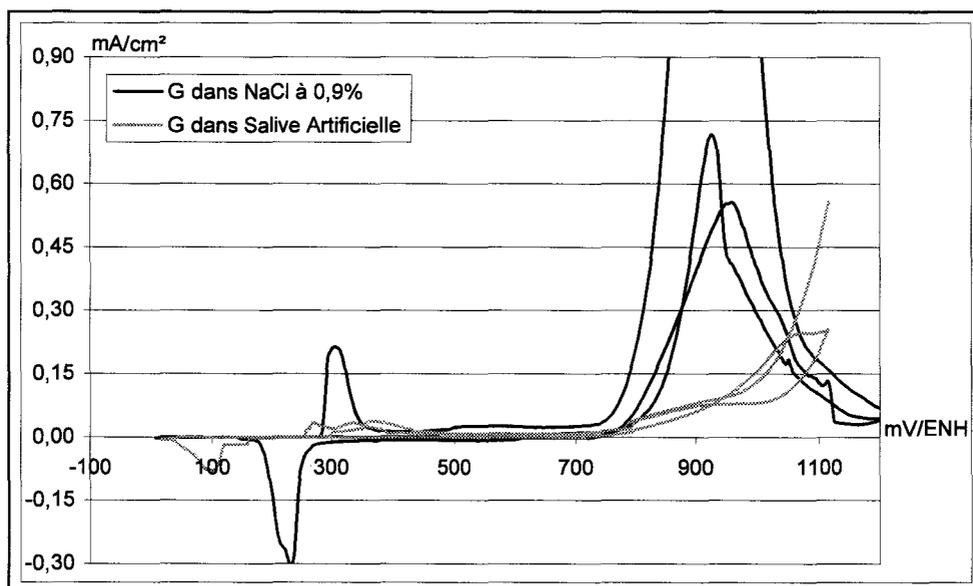


Figure 68 : Courbes de polarisation globale cyclique de G dans du NaCl à 0,9% et dans la salive artificielle, pH 6,7.

5.2.1.3 Polarisation anodique

Les courbes de polarisation anodique sont similaires aux courbes de polarisation globale. Cependant les courants mesurés se révèlent moins importants parce que les échantillons ne sont pas décapés cathodiquement. En effet la polarisation anodique mesure le courant anodique sur le substrat passivé *ex situ* avec l'oxygène de l'air.

5.2.1.4 Potentiel d'abandon dans le NaCl 0,9%.

Les manipulations à l'aide du réacteur 10 mesures (Figure 69) ont permis d'obtenir une moyenne et de classer les alliages suivant leur potentiel libre. Trois groupes se distinguent (Figure 70). Le premier groupe comprend les alliages E1, E2, E3, E4 et E9 qui ont des potentiels compris entre +350 et +450 mV/ENH (alliages riches en Pd). Le second groupe d'alliages s'étend sur des potentiels allant de +250 à +300 mV/ENH. Il s'agit des alliages E5, E6, E7, E10 et G. Les derniers alliages sont E8 et M qui ont des potentiels inférieurs à +200 mV/ENH.

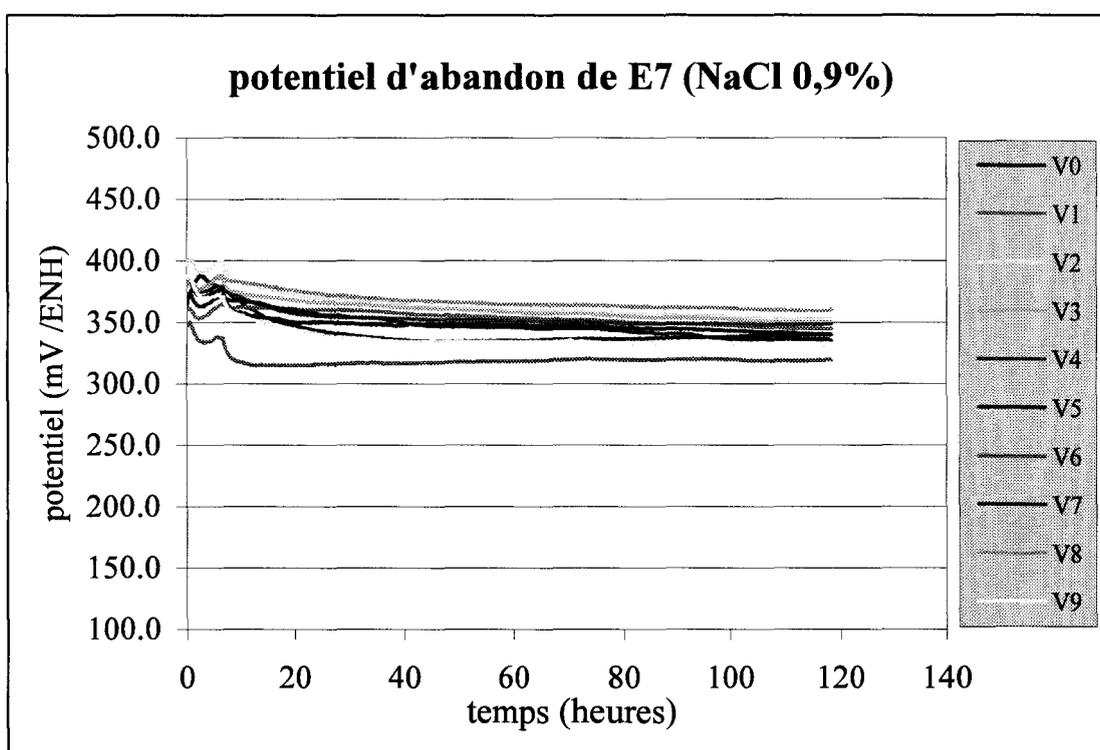


Figure 69 : Potentiel d'abandon obtenu avec le réacteur 10 mesures dans une solution de NaCl 0,9%.

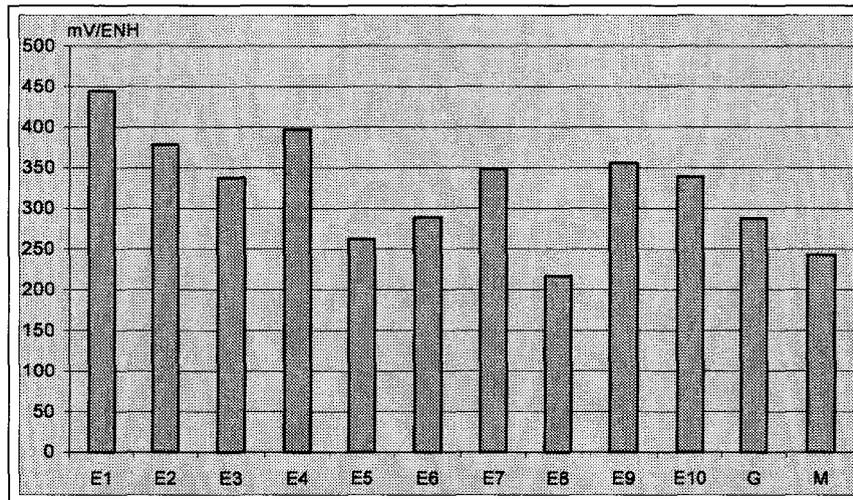


Figure 70 : Potentiel d'abandon dans une solution de NaCl 0,9%.

Les travaux de Brugirard [13] nous expliquent que l'évolution du potentiel d'abandon dans une solution varie avec la nature et la composition de l'alliage. En effet Brugirard constate que pour des alliages contenant du palladium, de l'or, de l'argent, du cuivre et du platine en proportions différentes, les potentiels les plus nobles sont atteints pour des alliages ne contenant pas de cuivre ou d'argent. Ces faibles potentiels libres peuvent être expliqués par la formation en surface d'une couche de chlorure d'argent ou de chlorure de cuivre. Enfin, l'effet cumulatif de l'argent et du cuivre apparaît également comme défavorable. C'est le cas des alliages E6 et G qui ont des potentiels peu élevés.

Le potentiel d'abandon donne une indication sur la noblesse d'un métal dans une solution donnée. Il est utile de le connaître lors du couplage galvanique entre deux métaux, pouvant se rencontrer en bouche. Nous pouvons ainsi connaître le métal qui se corrodera. Cependant, il n'est pas un critère suffisant pour étudier la susceptibilité à la corrosion des alliages. Les courbes de polarisation globale sont nécessaires pour connaître la sensibilité à la corrosion des alliages.

5.2.1.5 Interprétation

5.2.1.5.1 Alliages Pd-Ag-Au

5.2.1.5.1.1 Palladium

La polarisation globale du palladium fait apparaître un premier pic débutant vers -200 mV/ENH et atteignant un maximum vers $+50$ mV/ENH et un second pic aux alentours de $+800$ mV/ENH (Figure 71). Des auteurs expliquent le premier d'oxydation par la présence d'hydrogène dans la palladium absorbé par le métal quand celui-ci est polarisé négativement (-1000 mV/ENH) [13,19,34,66,72]. Puis quand le potentiel augmente ($+50$ mV/ENH), la désorption de l'hydrogène entraîne une augmentation du courant [99], puis la courbe présente une chute de courant qui correspond à l'immunité (Figure 3). Le second pic de la courbe de polarisation représente l'oxydation du palladium pour ce potentiel ($+800$ mV/ENH).

5.2.1.5.1.2 Argent

Certains auteurs [13,19] montrent sur la courbe de polarisation globale de l'argent un pic de corrosion très prononcé entre $+200$ et $+300$ mV/ENH. Le courant peut atteindre 5 mA. Après ce pic de corrosion, les produits de relargage forment une barrière qui diminue le passage du courant, cependant celui-ci reste encore élevé (2 mA). Le pic correspond à l'oxydation de l'argent en présence de Cl^- tel que $\text{Ag} + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$.

5.2.1.5.1.3 Alliages Pd-Ag: E1 et E5

Parmi les 12 alliages expérimentaux, seuls E1 et E5 ne contiennent que du palladium et de l'argent. La présence d'argent dans le palladium limite le pic d'hydrogénation observé sur la courbe de polarisation du palladium. A l'inverse, le pic de l'argent ne disparaît pas (Figure 71). Il semble néanmoins dépendre de la proportion d'argent contenu dans l'alliage. En effet, E1 en contient moins que E5 et a un pic moindre ($0,015$ mA au lieu de 7 mA). Le pic d'oxydation est caractéristique de la formation de chlorure d'argent (AgCl); il dépend donc de la quantité d'argent contenue dans l'alliage. Le second pic du palladium persiste.

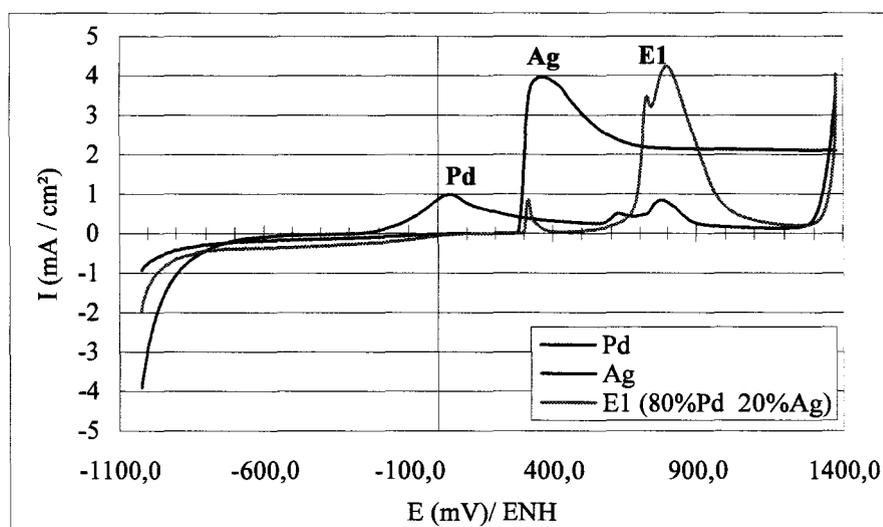


Figure 71 : Polarisation globale du Pd, Ag, E1 (NaCl 0,9%).

5.2.1.5.1.4 Influence de l'or

L'or pur est stable sur un grand domaine de potentiels (0 à +700 mV/ENH) dans le NaCl à 0,9%. Etant donné que les potentiels atteints en bouche sont compris entre +250 et +650 mV/ENH, l'or est considéré comme inoxydable en milieu buccal[13,19]. Son influence sur les alliages Pd-Ag se traduit par un allongement du domaine de passivité. En effet, pour les alliages E1 et E5, le domaine de passivité s'étend de +300 à +500 mV/ENH. Alors que pour les alliages E3 et E8 qui contiennent de l'or en plus, il s'étend de +400 à +900 mV/ENH. Cependant l'or ne permet pas de limiter le pic de l'argent.

Bien que l'argent apparaisse comme un métal moins résistant à la corrosion que le palladium, il permet de limiter l'hydrogénation du palladium. De plus, l'alliage Pd-Ag possède un large domaine passif compte tenu de son application. En effet, il sera utilisé en bouche où les potentiels ne dépassent pas +650 mV/ENH. L'alliage Pd-Ag apparaît donc comme un bon alliage pour les applications dentaires. L'ajout d'or a un effet bénéfique puisqu'il améliore la résistance à la corrosion de l'alliage en allongeant son domaine de passivité.

5.2.1.5.2 Alliages Pd-Au-Cu

5.2.1.5.2.1 Cuivre

Le cuivre possède un pic d'oxydation vers +200 mV/ENH (Figure 72 et Figure 73). Ce pic semble correspondre à la formation de chlorures de cuivre. Cependant, ces chlorures sont moins stables que les chlorures d'argent. En effet, le film se rompt rapidement (pour des potentiels de + 300 mV/ENH). Le cuivre débite alors des courants très élevés (16 mA). Le cuivre pur apparaît donc comme un métal peu résistant à la corrosion. Pour des raisons de dureté du matériau, il est ajouté au palladium dans les alliages dentaires.

5.2.1.5.2.2 Alliages Pd-Cu: E2 et E9

Malgré la grande sensibilité à la corrosion du cuivre, l'alliage Pd-Cu semble bien résistant. En effet, le cuivre diminue les intensités des pics de corrosion du palladium et élargit le domaine de passivité de l'alliage. De plus, le pic d'oxydation du cuivre est fortement diminué, voire inexistant pour certains alliages comme E2. Pour les alliages E2 et E9, le domaine passif s'étend de +400 à +1100 mV/ENH (Figure 72 et Figure 73). Les courants sont très faibles, ils ne dépassent pas 1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ sur ce domaine. Moore et Oshida [66] expliquent ce phénomène par une dissolution rapide du cuivre se trouvant en surface. La dissolution du cuivre laisse alors une surface noble constituée de palladium.

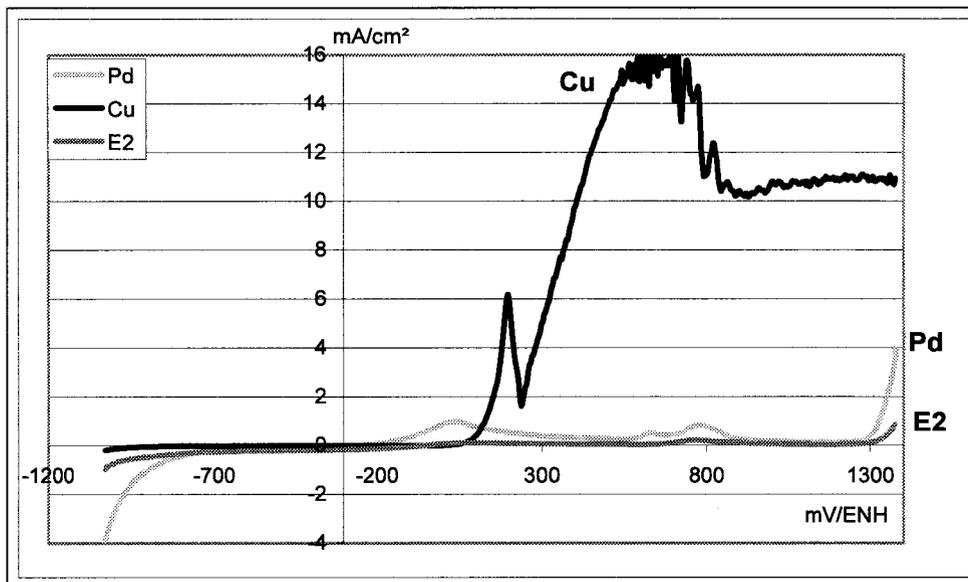


Figure 72 : Courbe de polarisation globale de Cu, Pd, E2 (NaCl 0,9%).

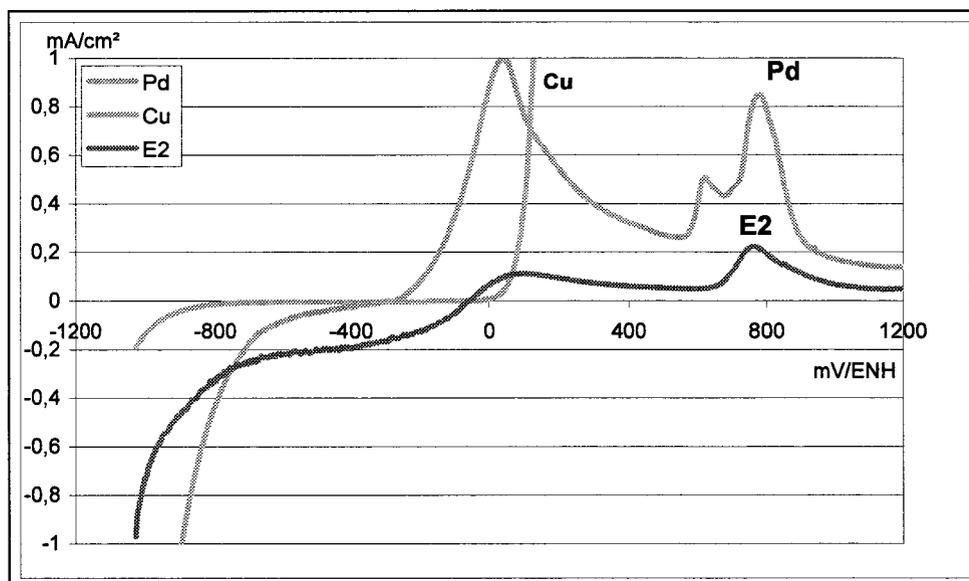


Figure 73 : Courbe de polarisation globale de Cu, Pd, E2 (NaCl 0,9%).

5.2.1.5.2.3 Alliages Pd-Cu-Au: E4 et E10

Bien que l'or soit un élément noble vis-à-vis de la corrosion, il n'améliore pas la résistance à la corrosion des alliages Pd-Cu. En effet, l'ajout d'or diminue la passivité. Pour les alliages E4 et E10, ce domaine s'étend de +400 à +700 mV/ENH. Les courants s'élèvent à $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, ils sont donc équivalents à ceux obtenus pour les alliages Pd-Cu.

Les alliages Pd-Cu ont une bonne résistance à la corrosion, mais l'ajout d'or peut être défavorable pour l'alliage, puisqu'il provoque une diminution de sa passivité. Ce phénomène peut être expliqué par un changement de la structure cristalline de l'alliage du fait de l'ajout d'or. La nouvelle structure cristalline semble alors sensible à la corrosion sélective.

5.2.1.5.3 Alliages Pd-Ag-Cu-Au

5.2.1.5.3.1 Alliage Pd-Ag-Cu: E6

La présence simultanée du cuivre et de l'argent dans le palladium est un facteur peu favorable. Dans le cas de l'alliage E6, l'ajout d'argent provoque un pic de corrosion aux alentours de +340 mV/ENH. Les courants sont importants: de l'ordre de 25 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Puis une passivité s'installe de +420 à +650 mV/ENH. A +650 mV/ENH, le film passif se rompt et l'alliage est fortement corrodé.

Dans le cas d'un alliage Pd-Ag-Cu, le domaine de passivité est fortement diminué et les courants débités sont importants. Un tel alliage résiste donc mal à la corrosion.

5.2.1.5.3.2 Alliages Pd-Ag-Cu-Au: E7, G et M

Le fait d'ajouter de l'or permet d'allonger un peu le domaine de passivité qui s'étend alors de +400 à +800 mV/ENH. Toutefois, le pic de l'argent est toujours présent et l'or n'a aucun effet sur les courants débités au moment de ce pic. En effet, les courants sont de l'ordre de 25 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Dans son mémoire, Charnay [19] attribue ce phénomène à une faible teneur en or (5-10%) associée à une grande quantité d'éléments facilement corrodables tels que l'argent et le cuivre.

5.2.2 Conclusion

Les alliages à base de palladium étant utilisés pour la réalisation de prothèses dentaires, ils sont en contact direct avec l'organisme. Il est donc important de connaître leur sensibilité à la corrosion dans le milieu buccal et leur biocompatibilité. Leur résistance à la corrosion a été déterminée à l'aide du bioréacteur et du réacteur 10 mesures. Nos résultats conduisent aux conclusions suivantes :

- * L'étude des potentiels d'abandon dans le NaCl 0,9% désaéré à 37°C a permis de classer les 12 alliages base palladium de la manière suivante: les alliages ne contenant pas de cuivre ou d'argent s'avèrent les meilleurs. Enfin les alliages contenant de l'argent en proportion importante ont les potentiels les plus bas. Cependant, le potentiel libre ne donne qu'une indication sur la noblesse de l'alliage. Il n'est pas suffisant pour déterminer la sensibilité à la corrosion de cet alliage.
- * Les essais menés à l'aide du bioréacteur dans le NaCl à 0,9% désaéré à 37°C, mettent en évidence l'influence des éléments d'alliages sur la résistance à la corrosion. Les alliages Pd-Ag et Pd-Cu ont les courants les plus bas et les domaines de passivité les plus étendus. L'ajout d'or est bénéfique aux alliages Pd-Ag et sans effet sur les alliages Pd-Cu.
- * La salive artificielle est plus proche du milieu naturel que le NaCl 0,9%. Elle est apparue moins agressive que le NaCl 0,9% pour les alliages.

5.3 ETUDE DE LA CYTOCOMPATIBILITE

Afin de mieux comparer les différents alliages, nous avons appliqué aux alliages expérimentaux les mêmes tests de cytocompatibilité déjà effectués sur les alliages commerciaux. En même temps, l'emploi de ces mêmes tests nous permettra de valider éventuellement notre modèle de cotation, d'autant plus, qu'il s'agit ici d'un nombre assez important d'une même catégorie d'alliages (base Pd) de composition parfaitement contrôlée.

5.3.1 Prolifération cellulaire

Les études de la prolifération cellulaire mettent en évidence une bonne réponse du Pd pur (de 50% à 3 jours et 80% à 6 jours) alors que le cuivre et l'argent témoignent d'une forte toxicité (prolifération toujours inférieure à 25%). Le Cu et l'Ag induisent une croissance cellulaire comparable à celle du Ni. Quant aux alliages E1 à E10, ils produisent une réponse intermédiaire en fonction de leur composition. Ces résultats expérimentaux montrent (Figure 74), que l'addition d'Ag au Pd dans les proportions 20 et 40 % ne modifie pas notablement la prolifération cellulaire par rapport au Pd pur alors que l'Ag, lorsqu'il est pur, induit une prolifération extrêmement faible voire nulle. Dès que le cuivre est additionné au Pd, il provoque également une diminution de la prolifération. Le cuivre seul est très toxique, comme l'argent.

5.3.2 Viabilité cellulaire

Le Palladium permet une survie cellulaire excellente puisqu'à 400 µg/ml, la viabilité cellulaire est encore de 95% (Figure 75). L'or présente aussi de bons résultats avec une viabilité de 88% à la même concentration. Il en est tout autrement pour le Nickel qui présente à 80 µg/ml une viabilité cellulaire de 20% seulement. La concentration létale 50% du Nickel est d'environ 40 µg/ml.

Les mêmes tendances que celles observées pour la prolifération cellulaire sont retrouvées sur les 12 alliages. De la même façon que précédemment, les alliages E5, E8 et G présentent de très bons résultats. Avec la concentration maximale, les 12 alliages présentent de bons résultats, tous supérieurs à 75% de viabilité cellulaire (Figure 75).

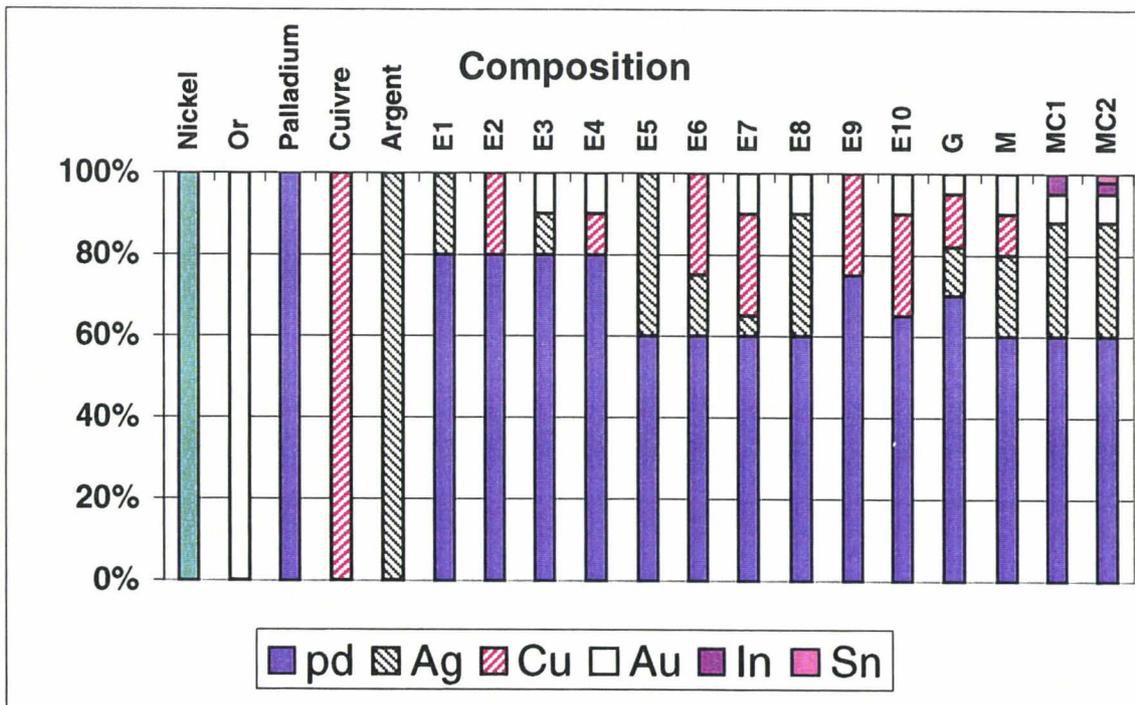
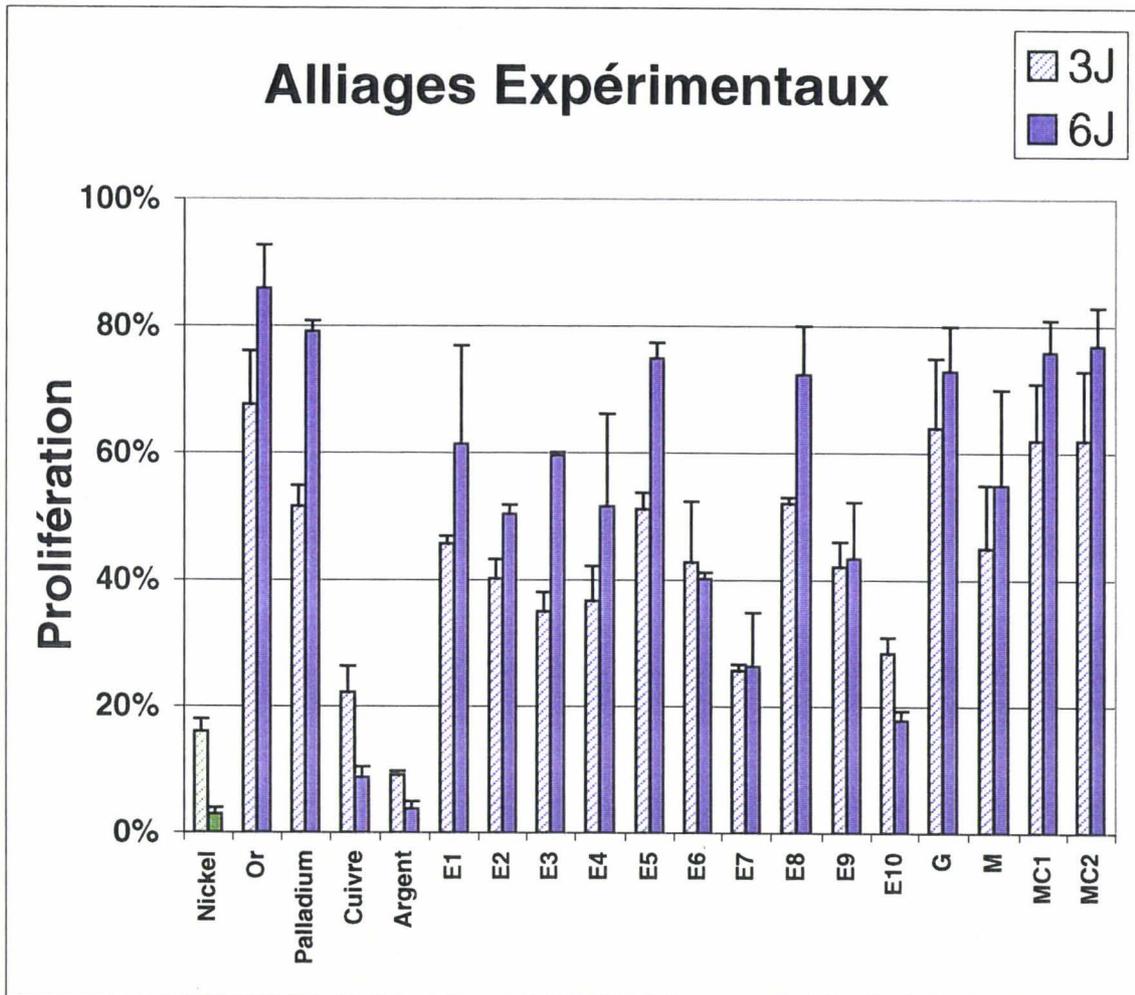


Figure 74 : Prolifération cellulaire.

Tableau 20 a : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages expérimentaux (n=6).

Viabilité

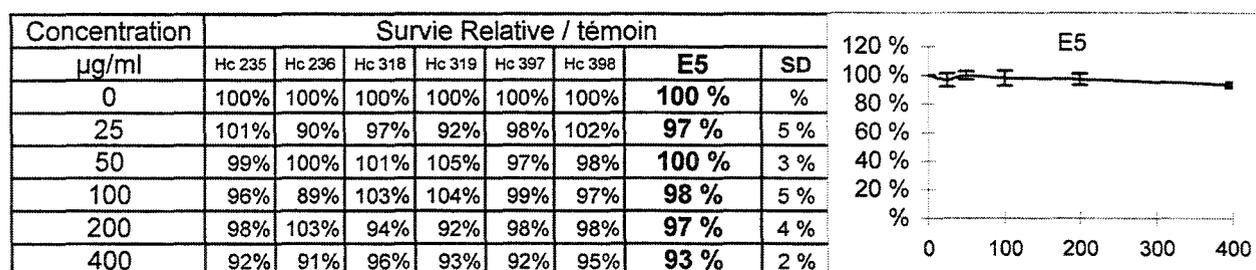
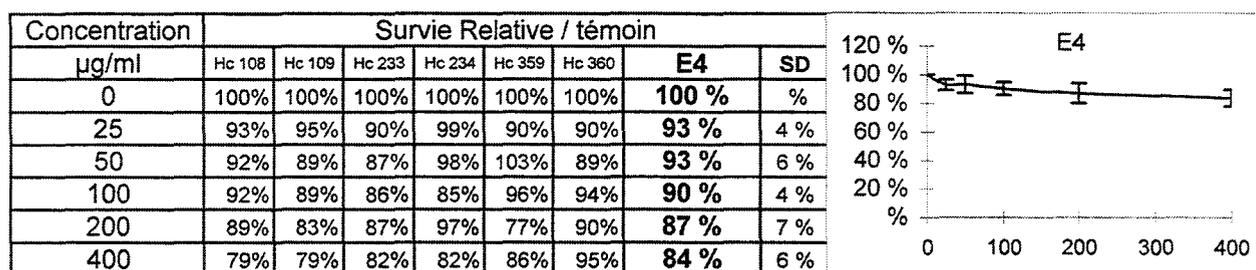
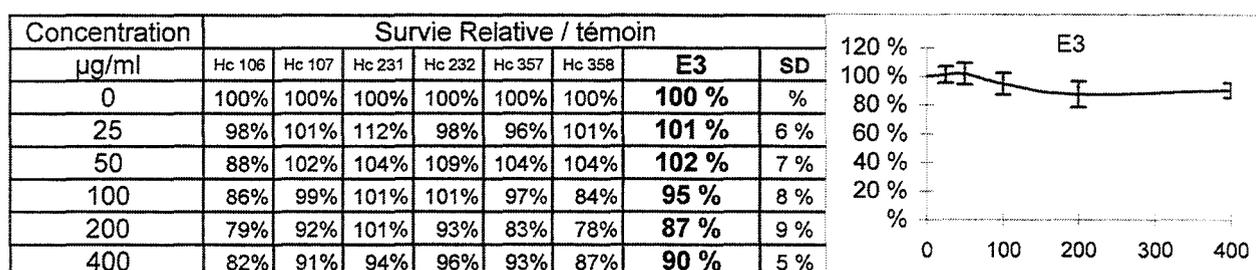
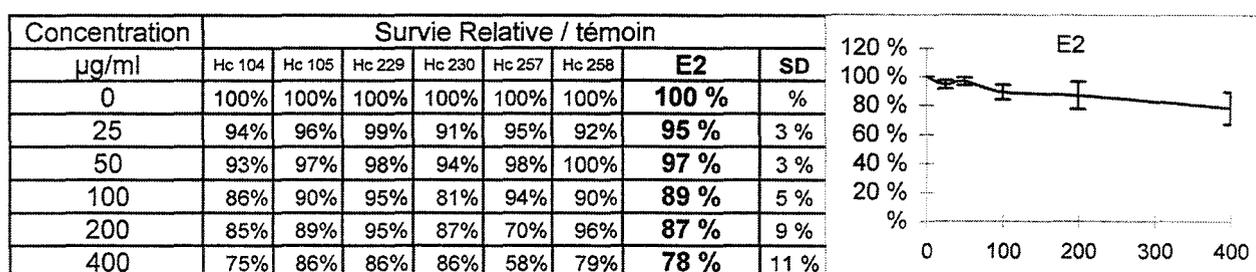
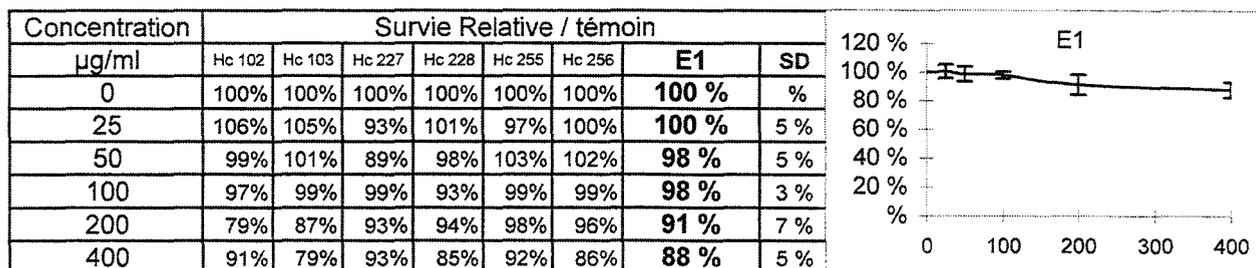
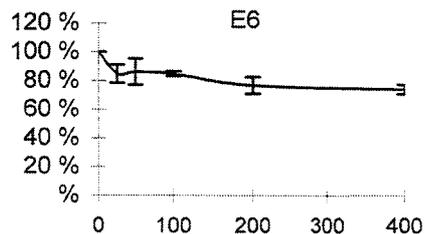


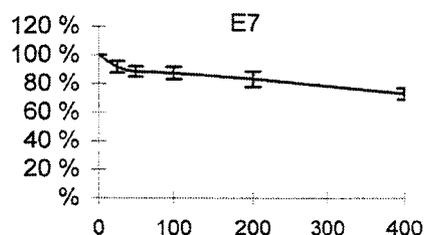
Tableau 20 b : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages expérimentaux (n=6).

Viabilité

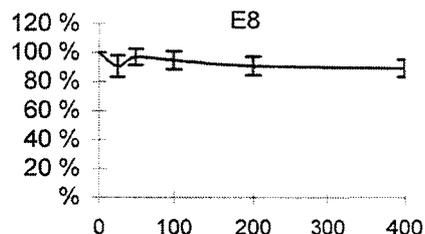
Concentration µg/ml	Survie Relative / témoin						E6	SD
	Hc 111	Hc 110	Hc 237	Hc 238	Hc 361	Hc 362		
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100 %	%
25	88%	91%	91%	83%	80%	76%	85 %	6 %
50	89%	88%	99%	82%	87%	72%	86 %	9 %
100	82%	87%	86%	86%	85%	84%	85 %	2 %
200	77%	76%	84%	82%	75%	68%	77 %	6 %
400	71%	74%	77%	77%	78%	71%	75 %	3 %



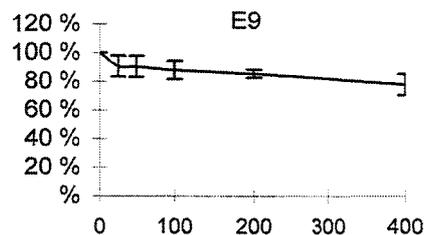
Concentration µg/ml	Survie Relative / témoin						E7	SD
	Hc 113	Hc 112	Hc 239	Hc 240	Hc 399	Hc 400		
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100 %	%
25	87%	98%	94%	90%	90%	91%	92 %	4 %
50	85%	93%	92%	87%	85%	89%	89 %	4 %
100	85%	88%	91%	92%	80%	89%	87 %	4 %
200	80%	77%	91%	88%	79%	84%	83 %	5 %
400	72%	78%	69%	79%	70%	74%	74 %	4 %



Concentration µg/ml	Survie Relative / témoin						E8	SD
	Hc 114	Hc 115	Hc 241	Hc 242	Hc 401	Hc 402		
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100 %	%
25	84%	97%	92%	83%	85%	101%	90 %	7 %
50	97%	87%	101%	101%	96%	100%	97 %	6 %
100	85%	92%	103%	93%	100%	94%	95 %	6 %
200	83%	83%	98%	95%	90%	95%	91 %	6 %
400	83%	83%	95%	89%	94%	96%	90 %	6 %



Concentration µg/ml	Survie Relative / témoin						E9	SD
	Hc 116	Hc 117	Hc 243	Hc 244	Hc 336	Hc 337		
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100 %	%
25	93%	86%	93%	89%	81%	103%	91 %	7 %
50	86%	82%	86%	93%	92%	103%	91 %	7 %
100	80%	83%	86%	90%	95%	94%	88 %	6 %
200	86%	86%	80%	88%	86%	87%	85 %	3 %
400	70%	75%	74%	77%	89%	86%	79 %	7 %



Concentration µg/ml	Survie Relative / témoin						E10	SD
	Hc 245	Hc 146	Hc 320	Hc 321	Hc 403	Hc 404		
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100 %	%
25	90%	101%	89%	91%	90%	86%	91 %	5 %
50	96%	95%	98%	92%	92%	87%	93 %	4 %
100	92%	94%	86%	87%	88%	89%	90 %	3 %
200	90%	82%	94%	91%	87%	84%	88 %	5 %
400	76%	79%	85%	89%	80%	85%	82 %	5 %

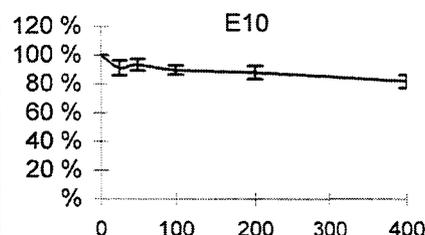


Tableau 20 c : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages expérimentaux (n=6).

Viabilité

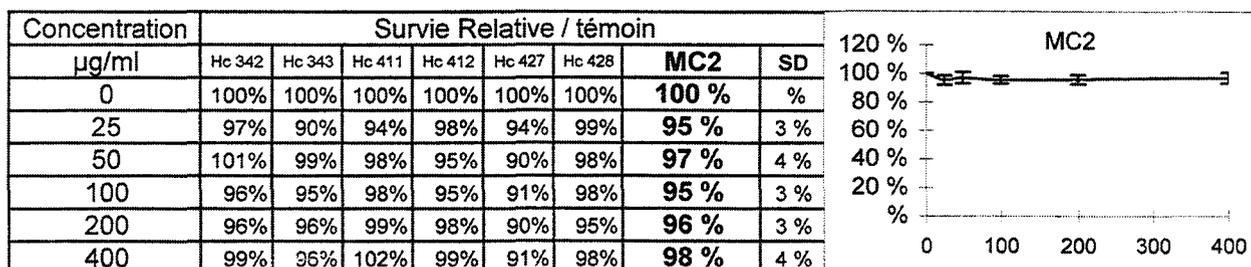
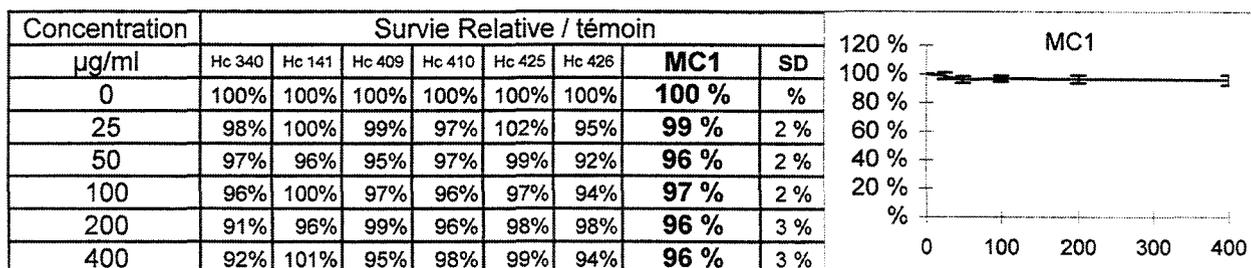
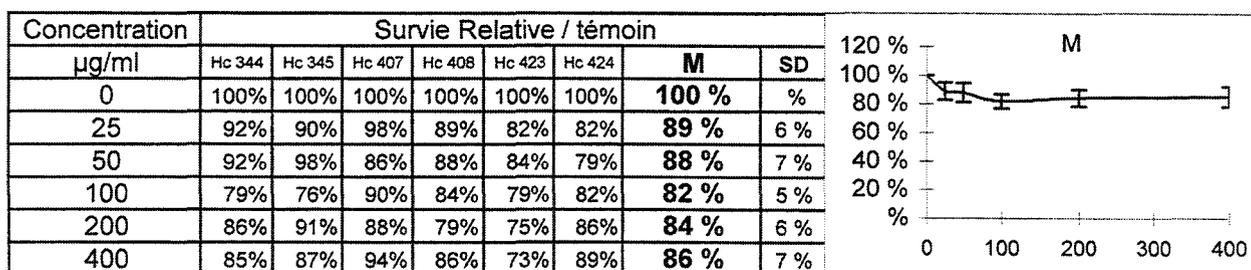
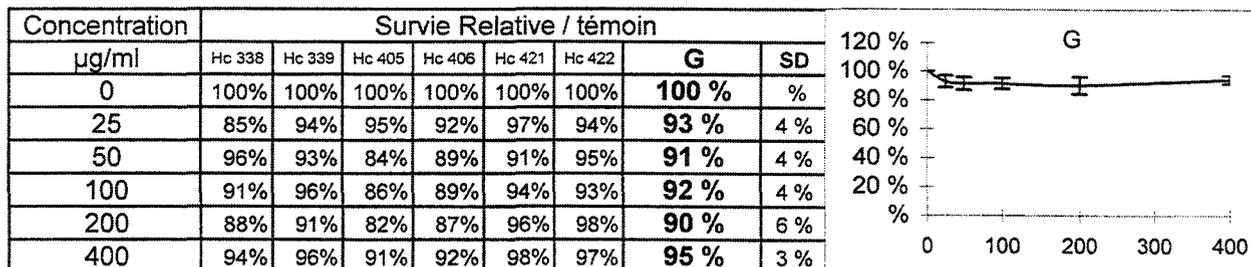
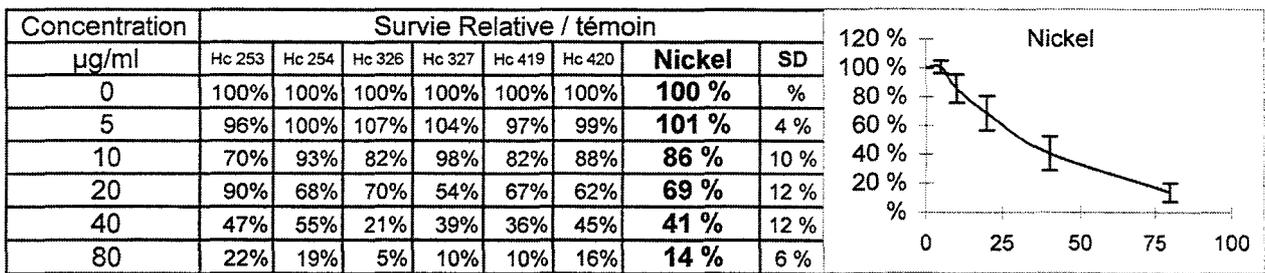
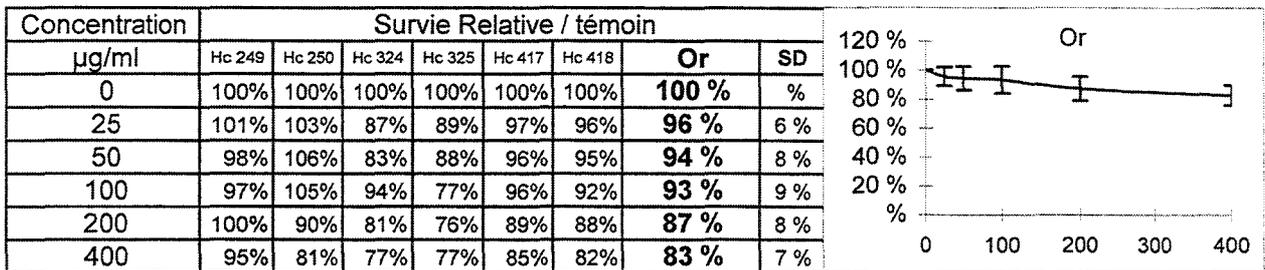
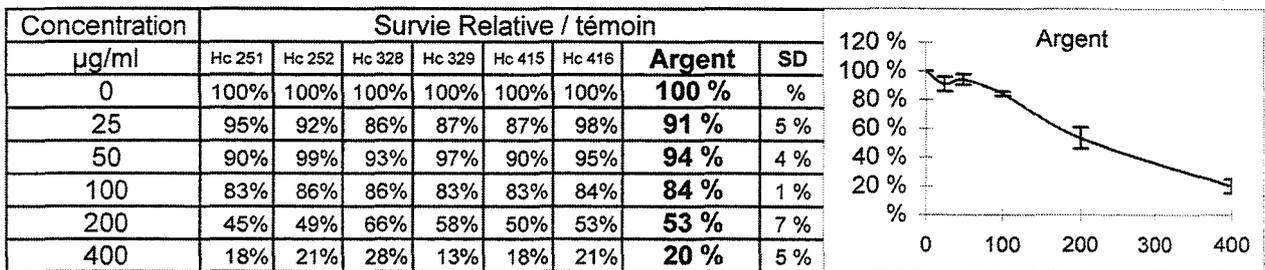
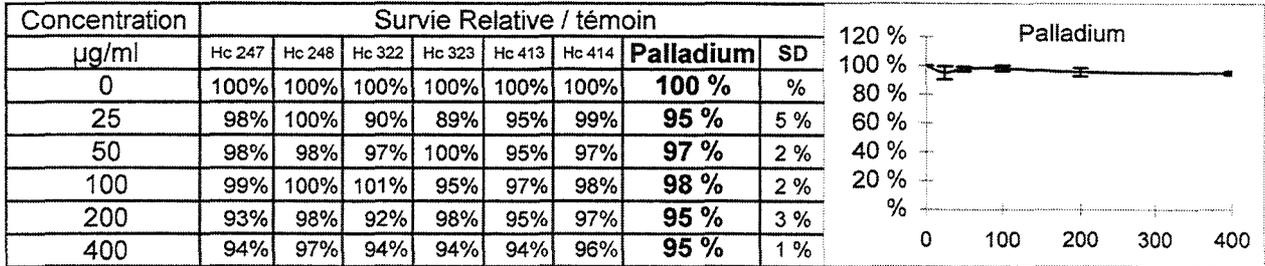


Tableau 20 d : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages expérimentaux (n=6).

Viabilité



Viabilité

µg/ml	Ni	Au	Pd	Cu	Ag	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	G	M	MC1	MC2	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
25	60	96	95	86	91	100	95	101	93	95	85	92	90	91	91	93	89	99	95	95
50	32	94	97	77	94	98	97	102	93	101	86	89	97	91	93	91	88	96	97	97
100	9	93	98	70	84	98	89	95	90	98	85	87	95	88	90	92	82	97	95	95
200	1	87	95	62	53	91	87	87	87	97	77	83	91	85	88	90	84	96	96	96
400	0	83	95	58	20	88	78	90	84	93	75	74	90	79	82	95	86	96	98	98

µg/ml	Ni
0	100
5	101
10	86
20	69
40	41
80	14

SD 400	1	10	1	6	6	5	11	6	6	2	3	4	6	7	5	3	7	3	4
--------	---	----	---	---	---	---	----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

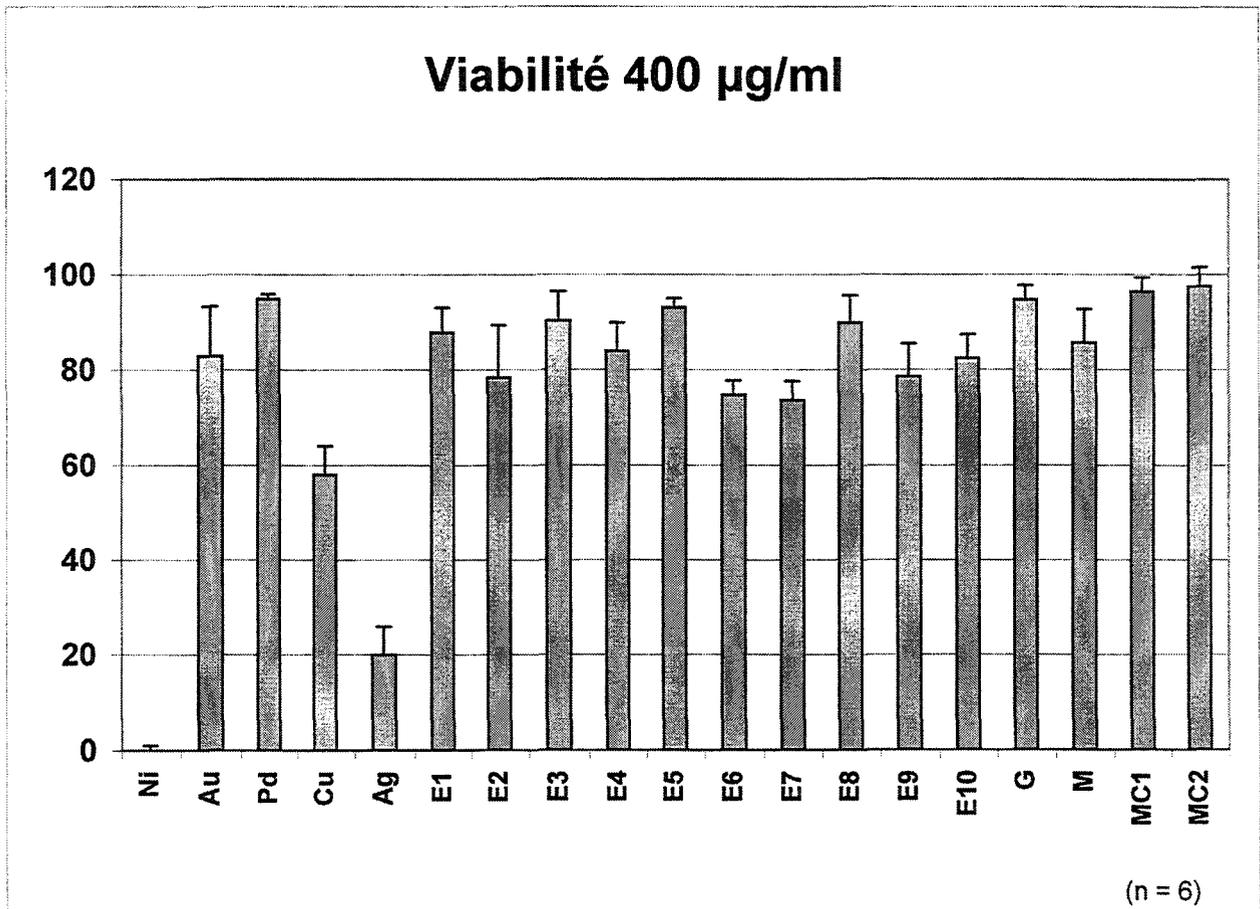


Figure 75 : Viabilité cellulaire.

5.3.3 Morphologie cellulaire

Après 3 jours de culture, nous constatons une morphologie cellulaire altérée (A) pour le cuivre (Figure 76) et l'argent (Figure 77). Une morphologie cellulaire légèrement altérée (LA) se retrouve pour deux alliages : l'alliage E2 (Pd-Cu) et l'alliage E7 (Pd-Cu-Ag-Au). Tous les autres alliages induisent une morphologie normale.

Après 6 jours, la morphologie altérée est toujours présente pour le cuivre et l'argent. La morphologie légèrement altérée se retrouve pour deux autres alliages : E9 (Pd-Cu) et G (Pd-Cu-Ag-Au) alors que E2 et E7 ont retrouvé une morphologie normale. Tous les autres alliages induisent une morphologie normale à 6 jours.

Quant au nickel, il induit une morphologie cellulaire altérée à 3 et 6 jours (tout comme le cuivre et l'argent).

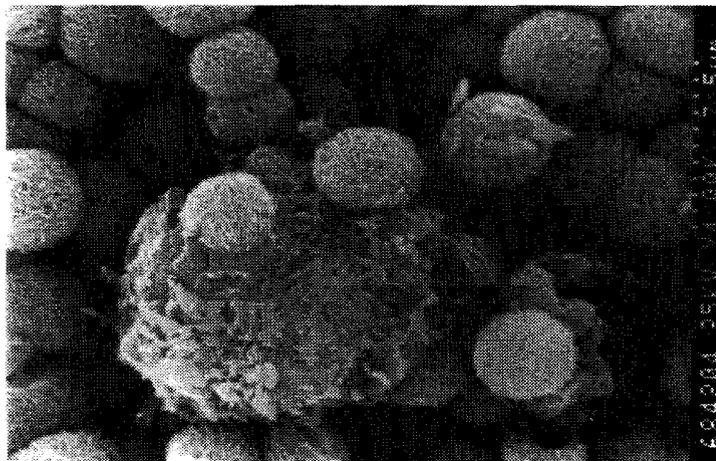


Figure 76 : Morphologie d'un fibroblaste NIH 3T3 sur un échantillon de cuivre.

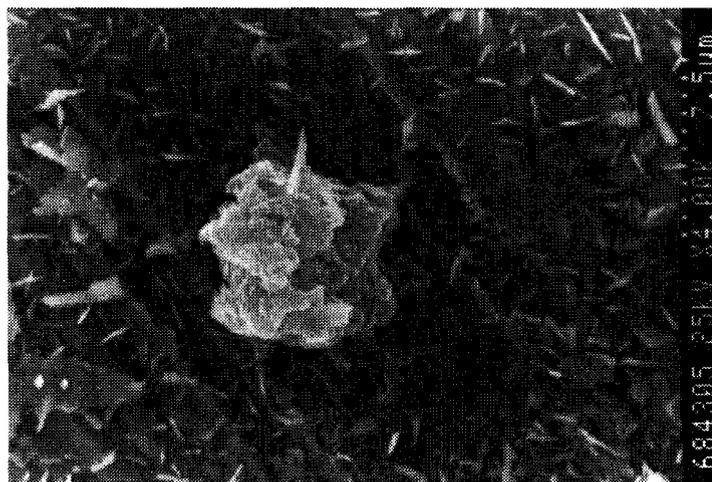


Figure 77 : Morphologie d'un fibroblaste NIH 3T3 sur un échantillon d'argent.

5.3.4 Test inflammatoire

En ce qui concerne l'effet inflammatoire, ce sont le cuivre et l'argent qui possèdent le pourcentage le plus élevé de CGM, 2,2% pour l'argent et 3,6% pour le cuivre. Quatre alliages induisent un taux de CGM supérieur à 3 %, ce sont les alliages (Figure 78) :

E10(Pd-Cu-Au) avec 3,4% de CGM,
E4(Pd-Cu-Au) avec 3,2% de CGM,
E2(Pd-Cu) avec 3,1% de CGM,
E7(Pd-Cu-Ag-Au) avec également 3,1% de CGM.

Tous les autres alliages provoquent l'apparition de CGM à des taux inférieurs à 3%.

5.3.5 Conclusion

Les quatre tests biologiques décrits ci-dessus ont donc permis de classer les alliages les uns par rapport aux autres selon des paramètres différents et d'appliquer l'Index de Cytotoxicité (Tableau 18) déjà établi pour les alliages commerciaux (§ 4.2.1).

Quant au test de viabilité, il s'avère que ces alliages n'ont pas provoqué d'effet cytotoxique notable. Ce seul paramètre de viabilité ne permet pas de séparer significativement les alliages les uns des autres.

La morphologie est plutôt un critère qualitatif qui nous a permis de distinguer quelques alliages par les altérations qu'ils provoquent. La morphologie est un facteur additionnel permettant de renforcer l'étude. Cependant, elle ne permet pas à elle seule de classer les alliages ni de distinguer une relation directe avec la composition.

Par contre, les tests de prolifération permettent d'obtenir des valeurs significativement différentes en fonction de l'alliage utilisé. Les résultats exprimés en pourcentage du témoin vont de 26% à 68% pour 3 jours et de 18% à 86% pour 6 jours.

Le test inflammatoire permet également de distinguer les alliages mais sur une étendue de valeurs inférieures (1% à 3,4%) à celles de la prolifération.

Nous observons que certains de ces alliages provoquent une certaine cytotoxicité. Dans ces conditions, puisque les alliages expérimentaux sont de composition assez homogène, nous tenterons d'établir l'origine de cette cytotoxicité.

Test Inflammatoire

Apparition de Cellules Géantes Multinucléées (CGM)

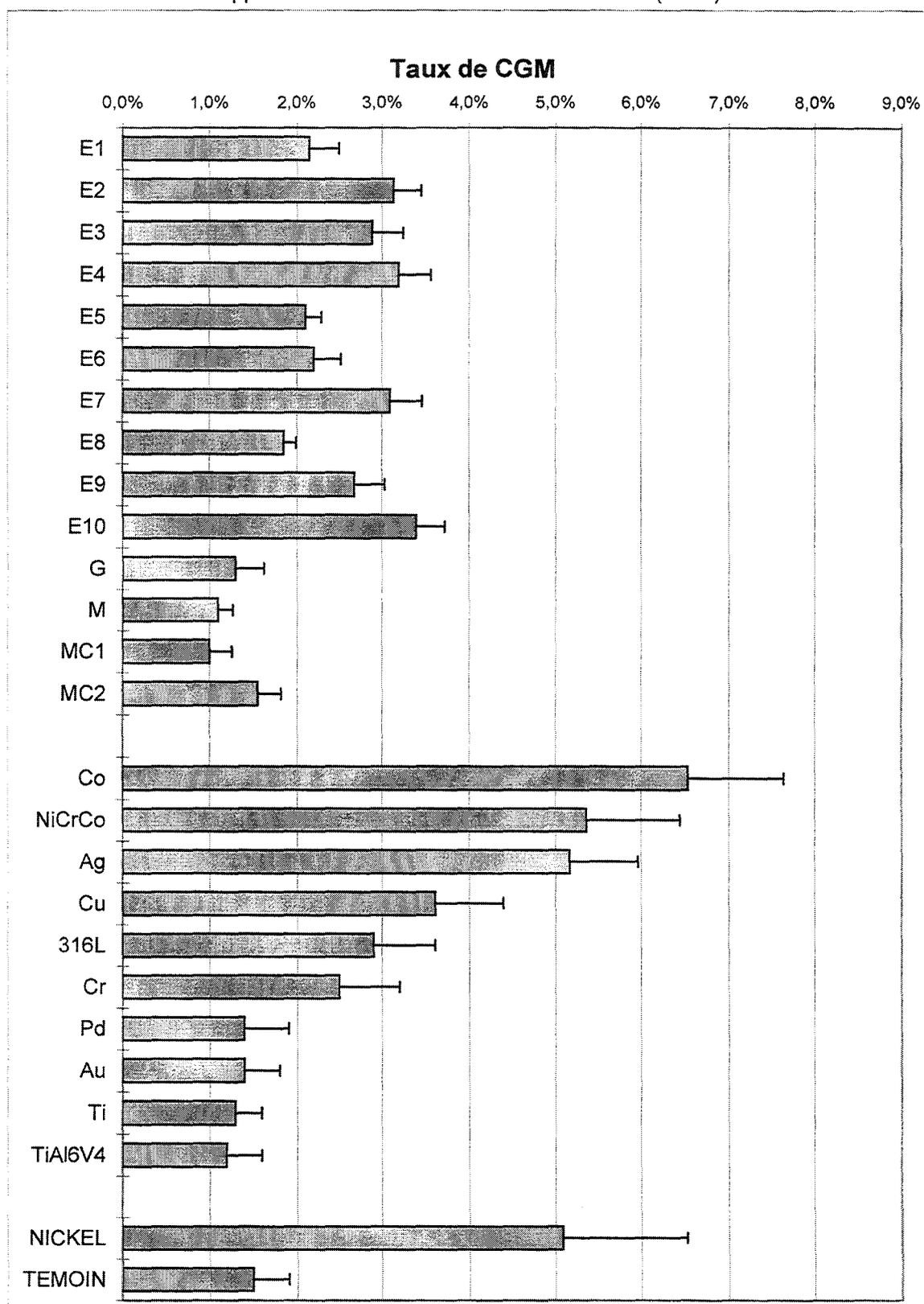


Figure 78 : Apparition de Cellules Géantes Multinucléées dans des cultures de cellules L132.

Evaluation biologique

Ref.	pourcentage atomique						pourcentage en masse						Viab.	Prolifération		Morph.	Infla.	Cotation					T	I.C.
	Pd	Cu	Ag	Au	In	Sn	Pd	Cu	Ag	Au	In	Sn	400µg	3 j	6 j	MEB	CGM							
Au	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0	0	0	1000	0	0	83%	68%	86%	N.N.	1,4%	2	4	2	0	0	8	18
MC1	62,5%	0,0%	28,8%	3,9%	4,8%	0,0%	600	0	280	70	50	0	96%	62%	76%	N.N.	1,0%	1	4	3	0	0	8	18
Pd	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1000	0	0	0	0	0	95%	52%	79%	N.N.	1,4%	1	5	3	0	0	9	20
G	65,8%	20,5%	11,1%	2,5%	0,0%	0,0%	700	130	120	50	0	0	95%	64%	73%	N.L.A.	1,3%	1	4	3	1	0	9	20
MC2	62,5%	0,0%	28,8%	3,9%	2,9%	1,9%	600	0	280	70	30	20	98%	62%	77%	N.N.	1,6%	1	4	3	0	1	9	20
E8	63,2%	0,0%	31,2%	5,7%	0,0%	0,0%	600	0	300	100	0	0	90%	52%	72%	N.N.	1,8%	1	5	3	0	1	10	23
E5	60,3%	0,0%	39,7%	0,0%	0,0%	0,0%	600	0	400	0	0	0	93%	51%	75%	N.N.	2,1%	1	5	3	0	2	11	25
M	58,9%	16,4%	19,4%	5,3%	0,0%	0,0%	600	100	200	100	0	0	86%	45%	55%	N.N.	1,1%	2	6	5	0	0	13	30
E1	80,2%	0,0%	19,8%	0,0%	0,0%	0,0%	800	0	200	0	0	0	88%	46%	61%	N.N.	2,2%	2	6	4	0	2	14	32
E3	84,0%	0,0%	10,4%	5,7%	0,0%	0,0%	800	0	100	100	0	0	90%	35%	60%	N.N.	2,9%	1	7	5	0	3	16	36
E6	51,4%	35,9%	12,7%	0,0%	0,0%	0,0%	600	250	150	0	0	0	75%	43%	40%	N.N.	2,2%	3	6	6	0	2	17	39
E4	78,3%	16,4%	0,0%	5,3%	0,0%	0,0%	800	100	0	100	0	0	84%	37%	52%	N.N.	3,2%	2	7	5	0	4	18	41
E2	70,5%	29,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	800	200	0	0	0	0	78%	40%	50%	L.A.N.	3,1%	3	6	5	1	4	19	43
E9	64,2%	35,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	750	250	0	0	0	0	79%	42%	43%	N.L.A.	2,7%	3	6	6	1	3	19	43
E10	57,9%	37,3%	0,0%	4,8%	0,0%	0,0%	650	250	0	100	0	0	82%	28%	18%	N.N.	3,4%	2	8	9	0	4	23	52
E7	53,5%	37,3%	4,4%	4,8%	0,0%	0,0%	600	250	50	100	0	0	74%	26%	26%	L.A.N.	3,1%	3	8	8	1	4	24	55
Cu	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0	1000	0	0	0	0	58%	22%	9%	A.A.	3,6%	5	8	10	4	5	32	73
Ag	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0	0	1000	0	0	0	20%	9%	4%	A.A.	5,2%	8	10	10	4	8	40	91
	Pd	Cu	Ag	Au	In	Sn	Pd	Cu	Ag	Au	In	Sn												
Nickel													5%	16%	3%	A.A.	5,1%	10	9	10	4	8	41	93
Témoin													100%	100%	100%	N.N.	1,5%	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 21 : Récapitulatif des compositions et des résultats biologiques obtenus sur les alliages expérimentaux et application de l'Indice de Cytotoxicité (I.C.).

5.4 DISSOLUTION IONIQUE

Pour évaluer la dissolution ionique des alliages expérimentaux à base de palladium, nous avons dans un premier temps utilisé de l'eau déminéralisée à 37°C comme solution d'extraction avec une surface d'exposition de 3cm²/ml. Les mesures des extraits sont effectuées par ICP. Dans un deuxième temps pour se rapprocher des conditions biologiques nous étudions la dissolution ionique après exposition des alliages expérimentaux dans le milieu de culture ayant servi aux proliférations cellulaires de 3 et 6 jours.

5.4.1 Dissolution ionique obtenue dans l'eau déminéralisée

Pour les métaux purs nous remarquons une faible dissolution du palladium à 3 jours (inférieure à 100 ppb) avec une légère augmentation à 6 jours. L'argent se voit également faiblement dissous à 3 jours (85 ppb) et 6 jours (150 ppb). La dissolution ionique de l'or n'a pas pu être détectée (Figure 79).

En ce qui concerne les alliages expérimentaux, la dissolution est, en règle générale, plus importante à 6 jours qu'à 3 jours au niveau de la dissolution du palladium. Elle est inférieure à la dissolution du palladium pur à 3 jours et peut être deux fois plus importante à 6 jours (E10). Les alliages ayant la plus forte dissolution du palladium sont E10 (Pd, Cu, Au), E9 (Pd, Cu), E7 (Pd, Cu, Ag, Au), E4 (Pd, Cu, Au) et E2 (Pd, Cu, Au), ce sont donc les alliages Pd/Cu et Pd/Cu/Au qui provoquent la dissolution de palladium la plus importante.

En ce qui concerne la plus faible dissolution ionique du palladium, nous trouvons les alliages E8 (Pd, Ag, Au), E5 (Pd, Ag), E1 (Pd, Ag) et E3 (Pd, Ag, Au). Nous constatons donc que les alliages Pd/Ag et Pd/Ag/Au induisent la plus faible dissolution de palladium.

Pour l'argent et l'or l'ICP n'a permis aucune détection significative.

Quant au cuivre, il se retrouve dans tous les extraits des alliages contenant du cuivre, 150 ppb, en moyenne à 3 ou 6 jours. Nous le retrouvons dans les extraits des alliages E10 (Pd, Cu, Au), E9 (Pd, Cu), E7 (Pd, Cu, Ag, Au), E6 (Pd, Cu, Ag), E2 (Pd, Cu, Au) et E4 (Pd, Cu).

La dissolution du cuivre est sensiblement identique à 3 et 6 jours. Nous constatons que les dissolutions les plus importantes en palladium sont accompagnées d'une dissolution importante en cuivre.

Dissolution sur 3 Jours				
	Ag	Au	Cu	Pd
Pd	-	-	-	92
Cu	-	-	3161	-
Ag	85	-	-	-
Au	-	-	-	-
E1	4	-	-	17
E2	-	-	37	54
E3	1	-	-	48
E4	-	-	25	54
E5	2	-	-	17
E6	-	-	10	23
E7	-	-	109	61
E8	1	-	-	9
E9	-	-	95	76
E10	-	-	94	83

Dissolution sur 6 Jours				
	Ag	Au	Cu	Pd
Pd	-	-	-	118
Cu	-	-	5680	-
Ag	159	-	-	-
Au	-	-	-	-
E1	1	-	-	42
E2	-	-	-	131
E3	4	-	-	82
E4	-	-	-	120
E5	1	-	-	38
E6	-	-	100	42
E7	-	-	141	156
E8	-	-	-	16
E9	-	-	104	176
E10	-	-	110	196

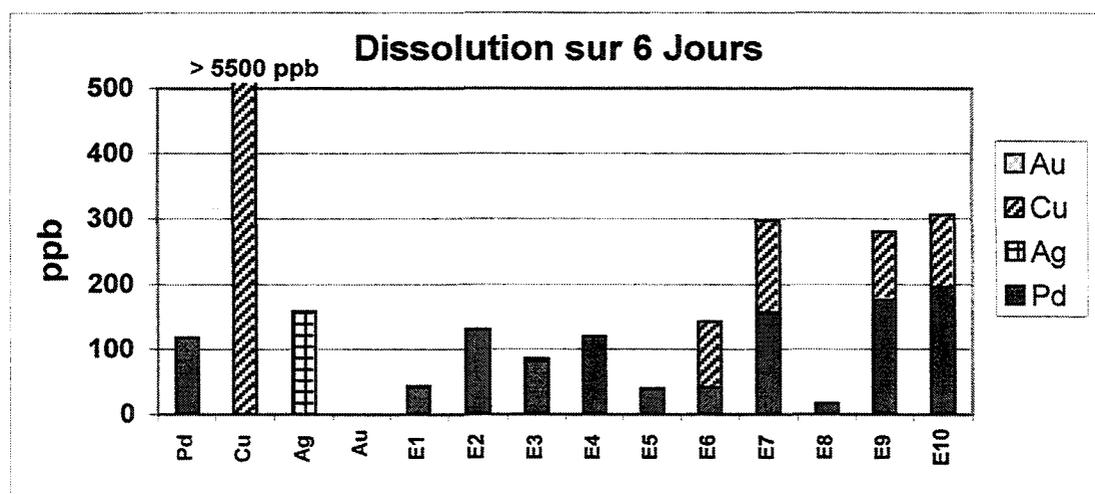
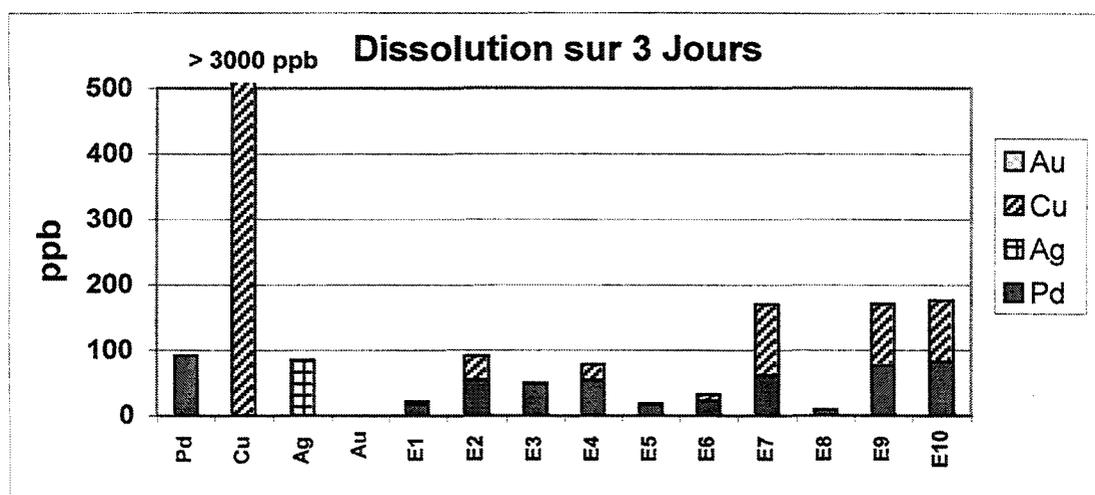


Figure 79 : Analyse par ICP de la dissolution des alliages expérimentaux dans l'eau (ppb)

5.4.2 Dissolution ionique dans le milieu de culture.

On remarque d'une façon générale que la dissolution des métaux purs est bien supérieure à celle obtenue dans l'eau déminéralisée. Cette augmentation est d'un facteur 5 pour le palladium avec 500 ppb et d'un facteur 20 pour l'argent, 1400 ppb après 3 jours de culture et 2800 ppb après 6 jours de culture. Nous remarquons donc un doublement de la dissolution de l'argent entre 3 et 6 jours (Figure 80).

L'or est désormais détectable mais il est faiblement dissout, 42 ppb à 3 jours et 49 ppb à 6 jours.

Le cuivre a subi une dissolution ionique extrêmement importante, elle s'est accrue d'un facteur 100 par rapport à l'eau déminéralisée avec 393 ppm à 3 jours et 392 ppm à 6 jours. Nous remarquons que la solution est déjà saturée en cuivre après 3 jours et la dissolution n'évolue plus à 6 jours.

En ce qui concerne les alliages expérimentaux, nous observons une dissolution pour le palladium contenu dans les alliages inférieure à celle du palladium pur que ce soit à 3 ou à 6 jours. Les dissolutions les plus importantes se retrouvent pour les alliages E2 (Pd, Cu, Au), E9 (Pd, Cu), E3 (Pd, Ag, Au), E4 (Pd, Cu) et E10 (Pd, Cu, Au). Ce sont donc majoritairement les alliages Pd/Cu et Pd/Cu/Au qui provoquent à nouveau une dissolution importante du palladium. Les dissolutions les plus faibles se retrouvent pour les alliages E8 (Pd, Ag, Au) et E5 (Pd, Ag).

Le cuivre est plus facilement dissout, sa dissolution ionique est de l'ordre de 250 ppb. Cette dissolution semble être proportionnelle à la quantité de cuivre contenu dans l'alliage.

D'une façon générale, nous remarquons une légère augmentation de la dissolution ionique globale à 6 jours par rapport à celle de 3 jours, elle est de l'ordre de 10 à 20 %.

Les dissolutions ioniques globales les plus importantes se retrouvent dans les extraits des alliages E6 (Pd, Cu, Ag), E9 (Pd, Cu), E2 (Pd, Cu, Au), E10 (Pd, Cu, Au) et E7 (Pd, Cu, Ag, Au), les plus faibles pour les alliages E8 (Pd, Ag, Au), E5 (Pd, Ag), E1 (Pd, Ag) et E3 (Pd, Ag, Au) (Figure 80).

Dissolution sur 3 Jours				
	Ag	Au	Cu	Pd
Pd	-	-	-	510
Cu	-	-	393228	-
Ag	1424	-	-	-
Au	-	42	-	-
E1	98	-	-	269
E2	-	-	959	525
E3	40	-	-	273
E4	-	1	321	378
E5	188	-	-	148
E6	100	-	780	237
E7	-	10	755	203
E8	-	-	-	50
E9	-	-	758	418
E10	-	6	819	360
G	54	1	564	236
M	98	5	465	212
MC1	23	1	-	94
MC2	44	-	-	93

Dissolution sur 6 Jours				
	Ag	Au	Cu	Pd
Pd	-	-	-	675
Cu	-	-	392538	-
Ag	2837	-	-	-
Au	-	49	-	-
E1	179	-	-	391
E2	-	-	866	584
E3	69	7	-	486
E4	-	2	334	479
E5	191	-	-	155
E6	151	-	1006	326
E7	-	4	916	274
E8	11	-	-	69
E9	-	-	954	547
E10	-	3	889	411
G	73	0	693	303
M	103	2	595	271
MC1	43	1	-	109
MC2	49	-	-	116

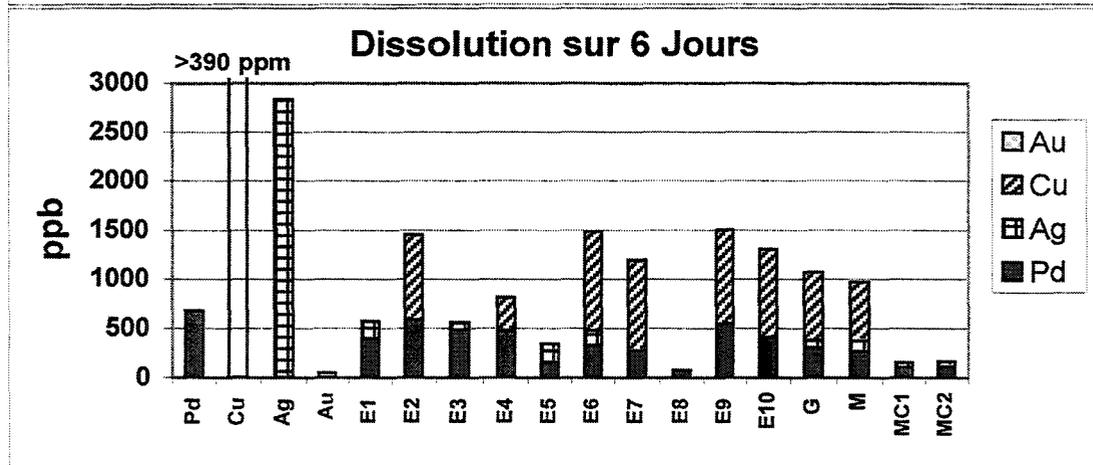
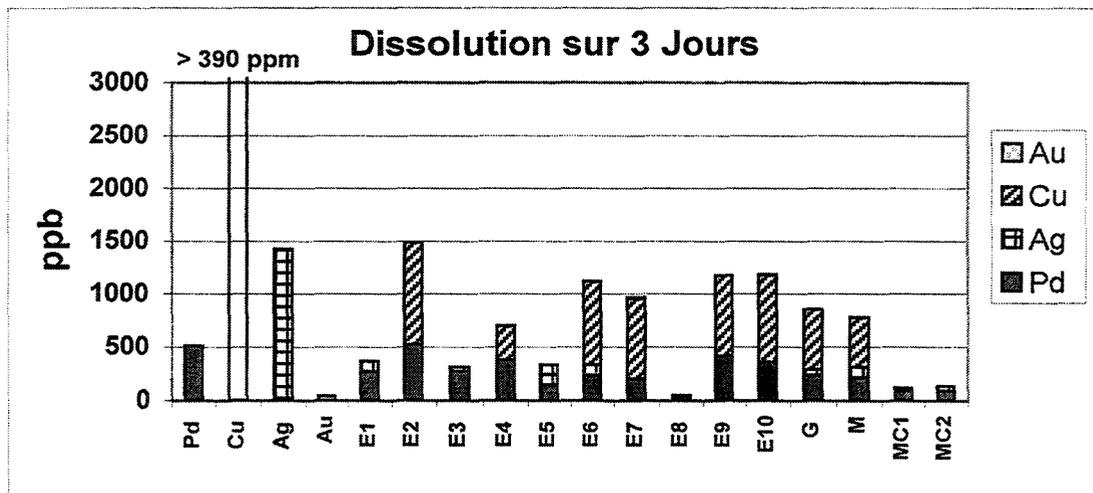


Figure 80 : Analyse par ICP de la dissolution ionique des alliages dans des milieux de cultures cellulaires (ppb).

5.5 APPORT DU PLAN D'EXPERIENCES

Les alliages sont de composition relativement simple car ils ne possèdent au maximum que 4 éléments. Cette simplicité de composition nous a permis de révéler certaines tendances. Nous notons que la présence de cuivre dans les alliages Pd-Ag n'est pas un facteur favorable. La présence d'argent dans le Pd ne semble pas modifier la réponse de l'alliage face aux tests biologiques. Mais 4 paramètres sont encore difficilement maîtrisables sans l'appui d'un calcul statistique. Le logiciel que nous utiliserons a été élaboré à l'Université d'Aix Marseille par MM. PHAN-TAN-LUU et D. MATHIEU, ce logiciel porte le nom de NEMERODE (New Efficiency Methodology Research Optimisation Design).

5.5.1 Optimisation d'une composition

Le plan mélange va nous permettre d'étudier quantitativement l'impact biologique que peut avoir l'addition d'un élément d'alliage. Pour cela le logiciel élabore un modèle mathématique qui prend en compte les différentes réponses biologiques en fonction des 11 compositions d'alliages décrites précédemment (E1-E10 et G). Le modèle correspond à une équation de courbe qui passe au plus proche des réponses données pour chaque composition, ceci tout en gardant une continuité entre les différents points. Il en résulte des courbes d'isoreponses en fonction de la composition.

Equation du modèle

$$\begin{aligned} \text{Prolifération} = & 140.990 \cdot \text{Pd} + 737.201 \cdot \text{Ag} + 394.832 \cdot \text{Cu} - 11325.965 \cdot \text{Au} \\ & - 1247.809 \cdot (\text{Pd} \cdot \text{Ag}) - 872.943 \cdot (\text{Pd} \cdot \text{Cu}) - 268.829 \cdot (\text{Ag} \cdot \text{Cu}) \\ & + 12204.359 \cdot (\text{Pd} \cdot \text{Au}) + 13039.548 \cdot (\text{Ag} \cdot \text{Au}) \\ & + 12441.659 \cdot (\text{Cu} \cdot \text{Au}) \end{aligned}$$

Tableau 22 : Résidu de la réponse.

exp	Pd	Ag	Cu	Au	y calc	y exp	Différence
E1	0.8	0.2	0	0	60.583	61	-0.417
E2	0.8	0	0.2	0	52.088	50	2.088
E3	0.8	0.1		0.1	60.835	60	0.835
E4	0.8		0.1	0.1	50.609	52	-1.391
E5	0.6	0.4			80.000	75	5.000
E6	0.6	0.15	0.25		40.557	40	0.557
E7	0.6	0.05	0.25	0.1	24.330	26	-1.670
E8	0.6	0.3		0.1	72.000	72	0.000
E9	0.75		0.25		40.774	43	-2.226
E10	0.65		0.25	0.1	20.227	18	2.227
G	0.7	0.12	0.13	0.05	70.000	73	-3.000
M	0.6	0.2	0.1	0.1	48.900	55	-6.100
MC	0.632	0.295	0.000	0.074	90.648	77	13.648

Les résultats observés indiquent que plus la quantité de cuivre est importante plus l'alliage est cytotoxique. Par contre dans le triangle Pd Ag Au et sur des coupes à concentration constante en cuivre, nous constatons (Figure 81) :

- pour 0% Cu nous obtenons une isoréponse de prolifération maximale de 11 (c'est à dire 70% de prolifération).

5% Au

21% Ag

74% Pd

- pour 12.5% Cu nous obtenons une isoréponse maximale de 8 (55% de prolifération).

4,2% Au

13,0% Ag

70,3% Pd

- pour 25 % Cu nous obtenons une isoréponse maximale de 5 (40% de prolifération).

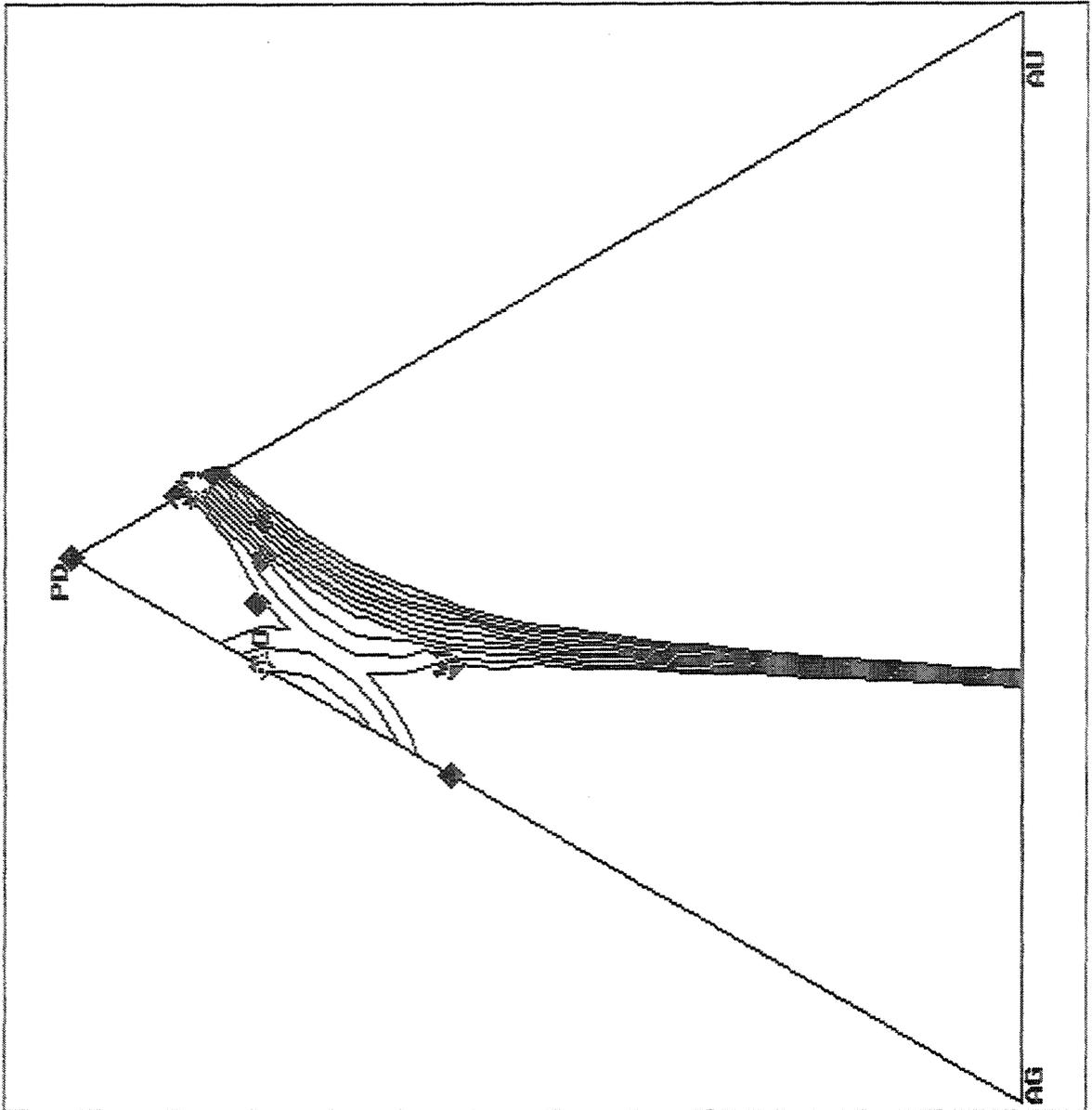
3,7% Au

5,1% Ag

66.1% Pd

Nous obtenons la meilleure réponse en terme de prolifération pour un alliage exempt de cuivre de composition : Pd₇₃₀ Ag₂₂₀ Au₅₀.

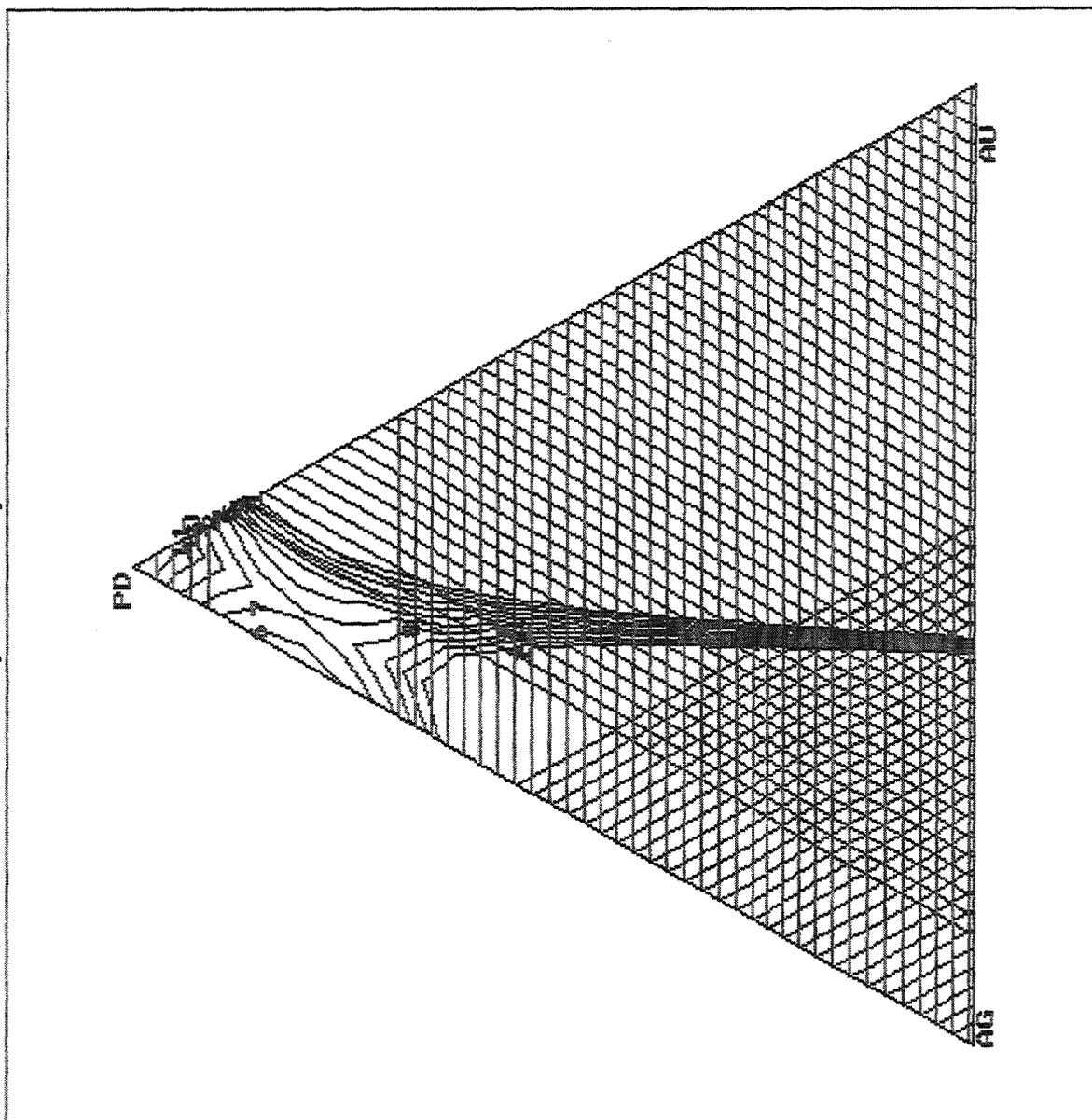
Etude de la réponse expérimentale PROL



Var. fixée(s) <small>VAR FIXEE(S) PROL</small> CU = 0.000	
Num.	PROL
<small>NUM PROL</small>	<small>PROL</small>
1 :	20.000
2 :	25.000
3 :	30.000
4 :	35.000
5 :	40.000
6 :	45.000
7 :	50.000
8 :	55.000
9 :	60.000
10 :	65.000
11 :	70.000

Figure 81 : Courbes d'isoreponse de prolifération cellulaire (0% Cu).

Etude de la réponse expérimentale PROL



Var. fixée(s)	

CU = 0.125	
Num. PROL	

1 : 20.000	
2 : 25.000	
3 : 30.000	
4 : 35.000	
5 : 40.000	
6 : 45.000	
7 : 50.000	
8 : 55.000	
9 : 60.000	
10 : 65.000	
11 : 70.000	

Figure 82 : Courbes d'isoreponse de prolifération cellulaire (12.5% Cu).

Etude de la réponse expérimentale PROL

Var. fixée(s)	
CU = 0.250	
Num.	PROL
1 :	20.000
2 :	25.000
3 :	30.000
4 :	35.000
5 :	40.000
6 :	45.000
7 :	50.000
8 :	55.000
9 :	60.000
10 :	65.000
11 :	70.000

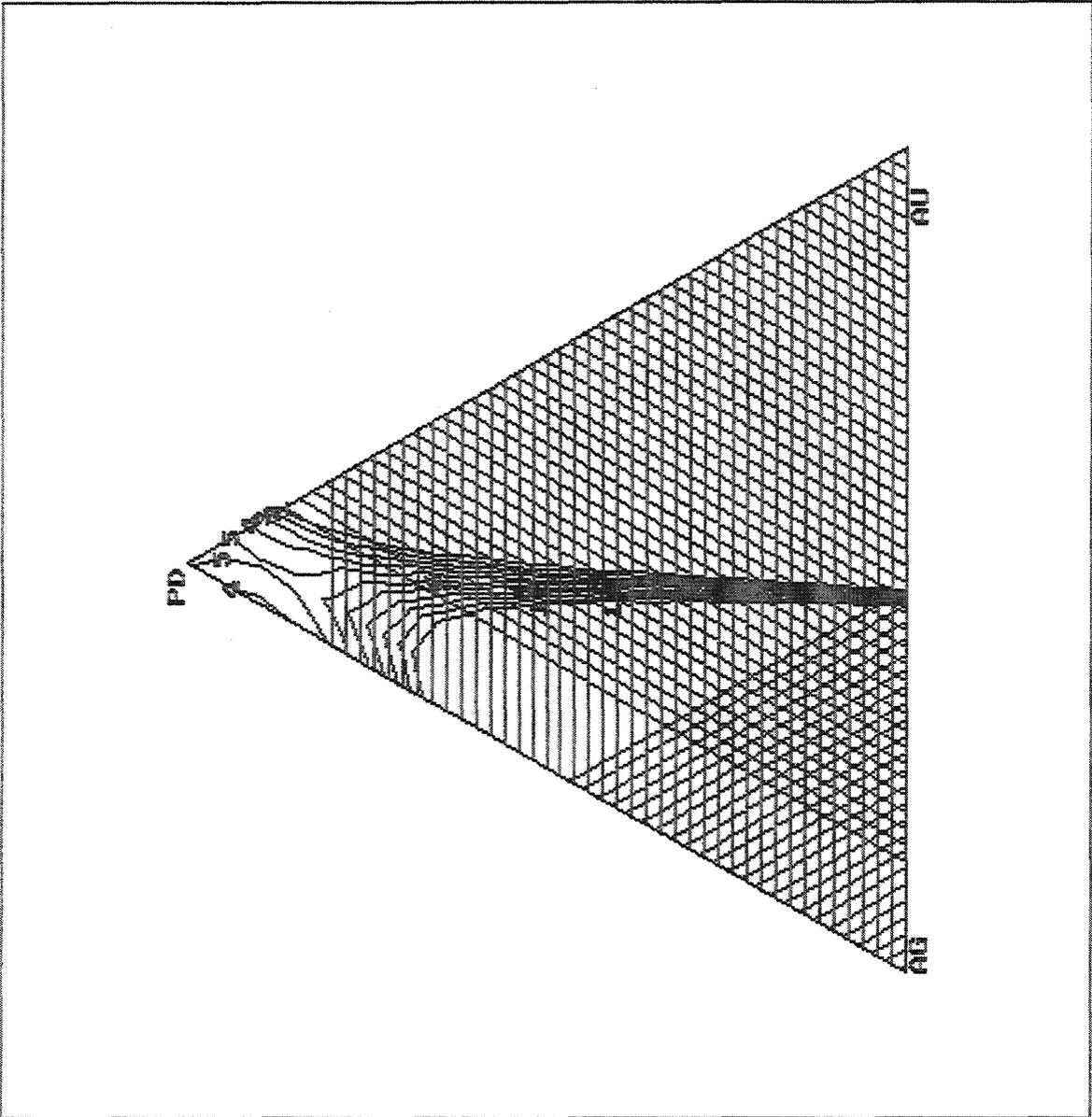
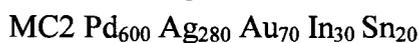


Figure 83 : Courbes d'isoreponse de prolifération cellulaire (25% Cu).

5.5.1.1 Addition d'étain et d'indium

L'alliage ayant la meilleure réponse biologique sera donc un alliage exempt de cuivre avec une composition proche de la composition décrite ci-dessus. Comme nous avons pu le voir, dans ces conditions l'alliage semble garder ses propriétés biologiques avec des variations de 5 à 10% en argent. Cependant pour permettre une bonne accroche de la céramique à l'alliage il est nécessaire de rajouter de l'étain ou de l'indium à la composition de l'alliage. Cette addition de In et Sn permet également d'adapter le coefficient de dilatation de l'alliage à celui de la céramique.

Nous choisissons de couler deux nouveaux alliages avec une addition d'indium pour l'un (MC1) et de In et Sn pour l'autre (MC2). Les compositions sont les suivantes :



Nous conservons 7% Au dans les alliages MC1 et MC2 pour ses propriétés antioxydantes qui évitent au palladium de noircir. L'addition d'argent reste importante pour des raisons de coût.

5.5.1.2 Evaluation Physico-chimique

Comme nous avons pu le voir au niveau de la microstructure, ces alliages semblent bien résister à la corrosion avec une structure présentant plus de dendrites dans MC1 que dans MC2.

5.5.1.3 Evaluation des résultats biologiques

Au niveau biologique, l'évaluation de ces deux alliages a déjà été traitée pour faciliter un regroupement des résultats. Les réponses biologiques obtenues avec ces deux alliages correspondent bien à notre attente. Ces alliages sont parfaitement cytocompatibles et font partie des meilleurs pour tous les tests. Leur réponse est comparable à celle du palladium pur.

5.5.2 Conclusion

Grâce au plan d'expérience il nous a donc été possible d'établir la composition d'un alliage ayant la meilleure réponse sur le plan biologique. Ceci d'une façon quantitative pour chaque élément. L'évaluation biologique de ces alliages confirme leur bon comportement, ce qui valide parfaitement le plan d'expériences. Les équations obtenues et le modèle mathématique peuvent donc être utilisés pour la formulation d'un alliage qui nécessite une bonne cytocompatibilité. Cependant les équations sont limitées au domaine d'étude, c'est à dire au domaine correspondant aux contraintes de composition établies par le cahier des charges :

Pd	600 – 800 millièmes
Cu	0 – 250 millièmes
Ag	0 – 400 millièmes
Au	0 – 100 millièmes

5.6 CORRELATION ENTRE LES RESULTATS

5.6.1 Corrélation composition – biologie

La quantité d'or contenue dans l'alliage ne présente apparemment aucune possibilité de corrélation avec l'index de cytotoxicité (Figure 84).

Nous constatons également qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre la quantité de palladium et l'index de cytotoxicité. Par contre la présence de cuivre dans l'alliage influence l'index de cytotoxicité avec un coefficient de régression $R^2 = 0,60$. L'addition de cuivre dans l'alliage semble donc être un facteur significativement défavorable à la cytotoxicité.

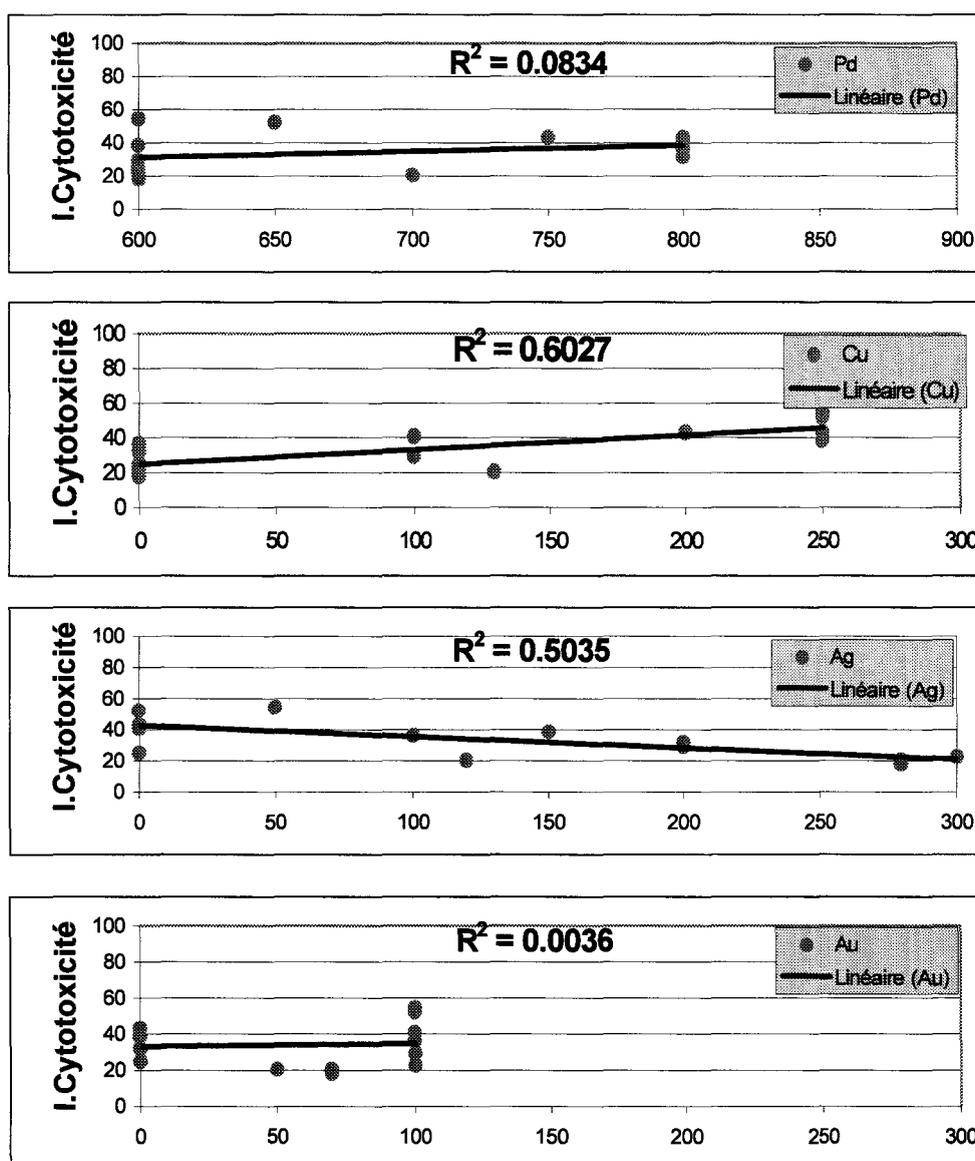


Figure 84 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Pd, Cu, Ag, Au, contenu dans les alliages (en % w/w).

5.6.2 Corrélation composition – relargage

Nous pouvons remarquer dans les graphiques ci-dessous (Figure 85) la relation qui existe entre la proportion de métal présent dans l'alliage et l'influence qu'il joue sur le relargage ionique de tous les éléments de l'alliage. Nous n'avons cependant pas pris en compte le relargage de l'or, trop faiblement dissous pour être significativement détecté par l'ICP. Un coefficient de corrélation négatif signifie que le métal considéré limite la libération ionique alors qu'un coefficient positif signifie qu'il la favorise.

Considérons les coefficients supérieurs à 0,8 : Nous pouvons alors constater que la présence de Ag dans l'alliage limite le relargage du palladium. La présence de Au limite le relargage de Ag, la présence de Cu favorise sa propre dissolution et que Pd favorise également sa propre dissolution.

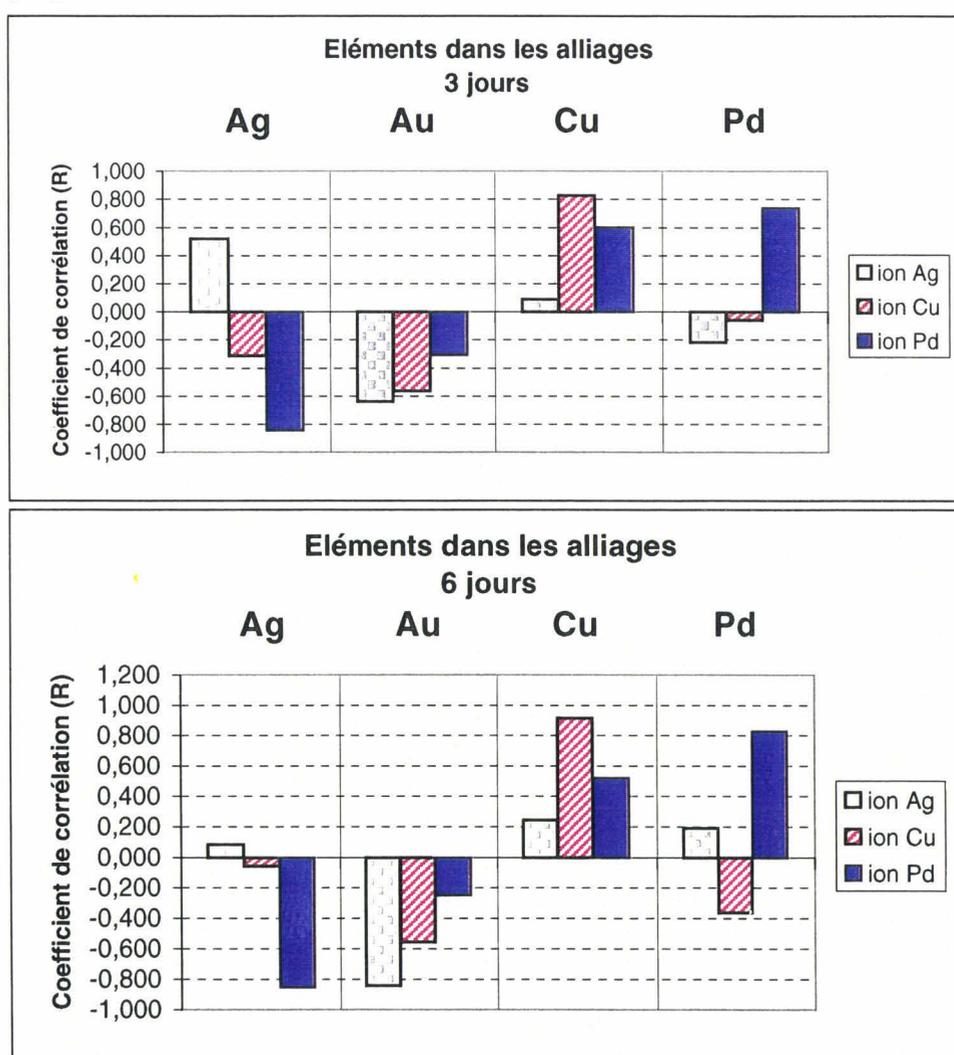


Figure 85 : Présentation graphique des coefficients de corrélations (R) obtenus entre la quantité des métaux dans l'alliage et la concentration en ions dissous dans le milieu de culture (colonnes).

5.6.3 Classement des alliages

Nous avons appliqué pour les alliages expérimentaux le même index de cytotoxicité déjà établi pour les alliages commerciaux avec une cotation de 0 (cytocompatible) à 100 (cytotoxique) (Tableau 21). Etant donné que ce groupe d'alliages est très homogène, nous voulons comparer à nouveau le classement obtenu avec la composition des alliages et métaux purs (Figure 86).

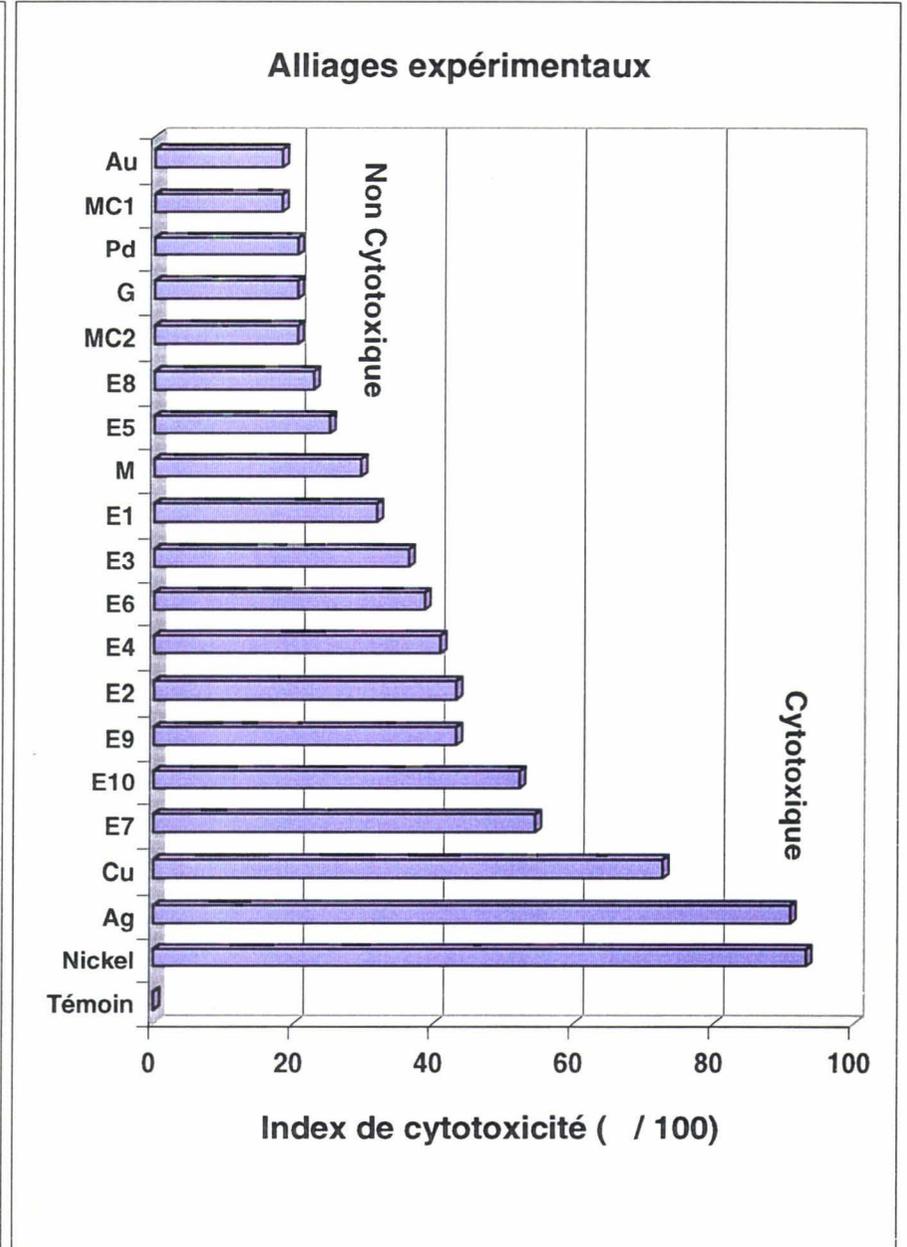
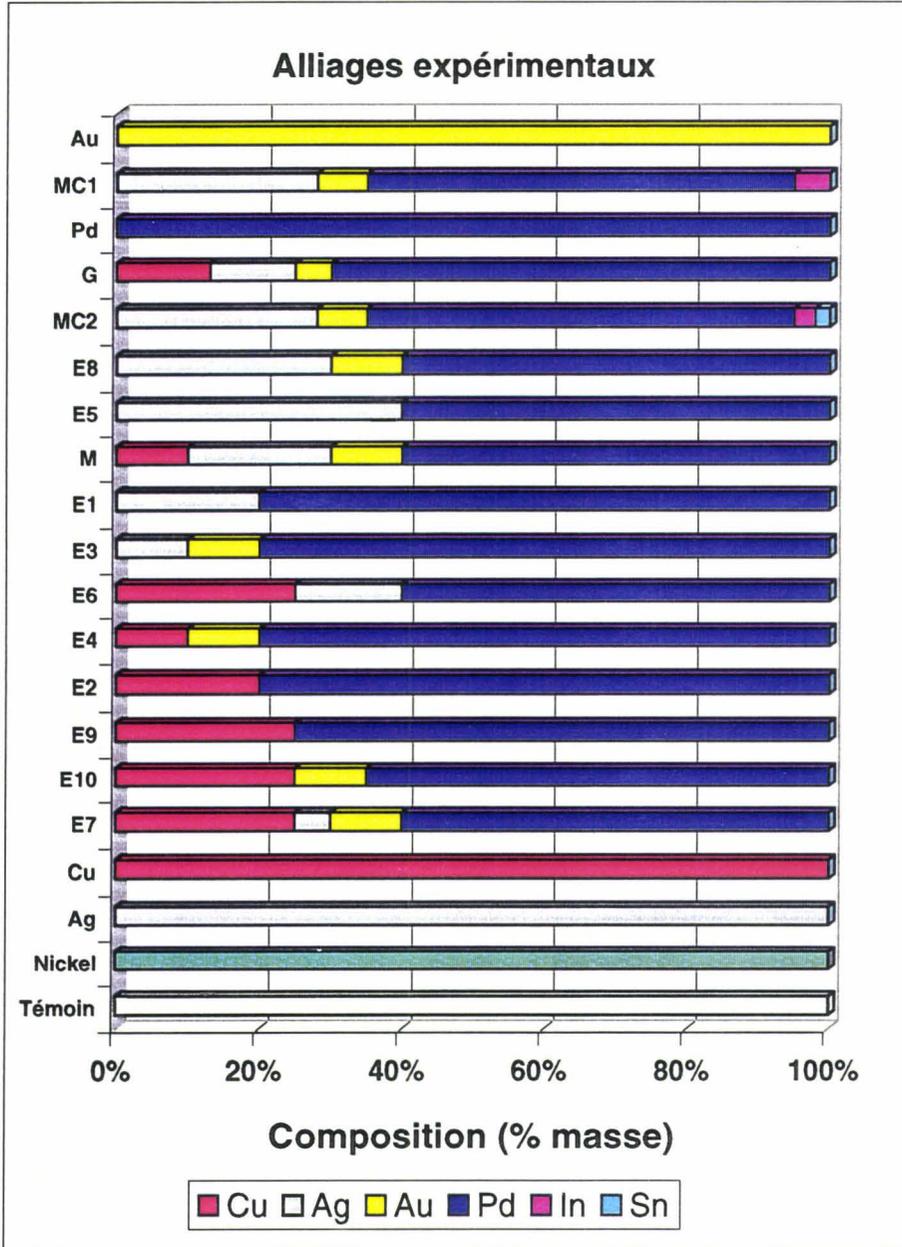
Nous constatons immédiatement que presque tous les alliages contenant du cuivre se placent dans le domaine moins favorable que les alliages sans cuivre mais contenant plus d'argent.

Ni le palladium ni l'or ont un impact défavorable sur leur comportement biologique. En effet, l'or pur et l'alliage MC1 garantissent une quasi parfaite cytocompatibilité, suivis directement (à 2/100 points) par le Pd pur et les alliages G et MC2.

Si l'on compare les alliages de moins bon classement avec leur dissolution ionique (Figure 68), nous notons que ce sont ces alliages qui relarguent le plus de cuivre, notamment en milieu biologique comme les milieux de culture cellulaires E7, E10, E9, E2, E4, E6 dans l'ordre de cytotoxicité décroissante.

Le cuivre et l'argent purs sont fortement cytotoxiques, et la cytotoxicité de l'argent est comparable à celle du nickel.

Figure 86 : Classement des alliages expérimentaux en fonction de leur Index de Cytotoxicité.



6 DISCUSSION

Notre travail s'est essentiellement porté sur des alliages à base de palladium qui sont de plus en plus employés comme alliages céramo-métalliques du fait de leur haut point de fusion. Ils sont également concurrents des alliages à base d'or au niveau de leur coût qui était largement inférieur jusqu'en 1996.

Dès le début de notre décennie et pour des raisons plutôt économiques que scientifiques, le palladium fait l'objet d'une grande controverse, voire d'une polémique. Connaissant les qualités et performances physico-chimiques du palladium, les détracteurs s'attaquent notamment aux performances biologiques encore peu étudiées à cette époque [1].

Depuis, les effets biologiques du palladium ont été largement étudiés et nous savons que les sels du Pd, et plus particulièrement les composés organiques, peuvent induire sur l'animal des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques [49,50,51,53,79]. Par contre, le Pd métallique assure une cyto- et biocompatibilité identique à celle de l'or et du titane. Ces études montrent parfaitement que la spéciation d'une substance chimique est particulièrement importante quant à son effet toxique, et que l'on doit faire la différence entre l'action d'un métal à l'état pur et celle de ses dérivés minéraux ou organiques.

Il est à noter que généralement les sels de métaux sont bien plus toxiques que les oxydes qui sont eux-mêmes plus toxiques que les métaux purs. Cela s'explique par la biodisponibilité décroissante de l'élément. De ce fait le premier facteur de risque de cytotoxicité d'un alliage est fonction de sa solubilité.

L'étude bibliographique indique que la toxicité d'un élément à part entière tel que l'argent, le cuivre ou le palladium est fonction du milieu d'ou il provient et de celui dans lequel il se retrouve. La toxicité d'un élément ne peut donc être un critère suffisant pour déterminer la toxicité d'un alliage. L'étude de l'alliage en lui-même doit être effectué pour déterminer sa toxicité.

Pour le présent travail, nous avons étudié deux groupes d'alliages : La première série est constituée de 36 alliages commercialisés de composition variable. La seconde série représente un groupe très homogène de 14 alliages expérimentaux à base de palladium contenant du cuivre, de l'argent et de l'or.

En ce qui concerne les alliages commerciaux, dont la composition était déjà établie, la première étape du travail a consisté en leur élaboration. Pour ce faire, nous avons coulé un barreau de 15 mm de diamètre nécessaire à la fabrication de pastilles normalisées pour les tests de cytocompatibilité. Il s'est avéré que la préparation standard de coulée à la cire perdue n'a pu être appliquée pour notre étude car les structures métallographiques obtenues étaient alors différentes de celles des restaurations dentaires commercialisées. En effet, la masse de métal (200g) mise en œuvre pour la réalisation des barreaux est bien supérieure aux quelques

grammes généralement utilisés pour la réalisation des éléments prothétiques. Les vitesses de refroidissement s'en trouvent donc modifiées.

Nous avons donc choisi de réaliser nos barreaux par une coulée dans une lingotière métallique. La structure de l'alliage obtenu est désormais comparable aux restaurations commercialisées. Après refroidissement nous prenons soin de réajuster au tour le diamètre du barreau à 15 mm. Cette opération nous permet d'éliminer la "peau" du barreau dont la composition est souvent différente de celle de la "matrice".

Nous prenons soin de reproduire des cycles de cuisson céramique pour les alliages le nécessitant, ce qui nous amène à obtenir des pastilles dont la structure peut-être assimilée à celle des reconstitutions dentaires.

Ces conditions étant remplies, il est alors possible d'effectuer les tests de cytotoxicité et de traiter les résultats comme correspondant aux alliages effectivement mis en place chez le patient. Les pastilles sont utilisées pour les tests de prolifération et de morphologie.

La préparation des poudres demande également une attention particulière. Les poudres ont été préparées à l'aide d'une meule en carbure de tungstène, pour éviter, d'une part, la formation d'oxyde lors d'une atomisation et, d'autre part, toute contamination avec un élément pouvant provoquer un effet toxique. Ensuite nous avons séparé par décantation une fraction de particules de diamètre inférieur à 50 μm , taille préconisée par les normes ISO et EN. Dans notre cas, les particules ont un diamètre moyen inférieur à 30 μm avec une surface spécifique de l'ordre de 1 m^2/g .

La taille des particules joue un rôle assez important pour les tests de cytotoxicité. Lors du "International Symposium on Trace Elements in Health and Disease" à Espoo en Finlande, en 1990 [12], la taille des particules pour essais en toxicologie a été déterminée inférieure à 5 μm . Cette taille permettrait aux cellules, elles-mêmes entre 10 et 40 μm de diamètre, de phagocyter les particules et les métaboliser assez facilement. Nous ne comprenons pas pourquoi les normes ISO et EN ont fixé la taille à un ordre de grandeur plus élevé, d'autant plus, que les cellules n'ont pratiquement aucune possibilité de les phagocyter. Cette décision est probablement due à un problème technico-économique, puisqu'il est assez difficile d'obtenir de fines particules techniquement parlant identiques à l'alliage même, sans parler du coût de revient particulièrement élevé. Lors de la préparation des poudres, nous avons pu nous rendre compte de cette difficulté, mais nous avons essayé de nous rapprocher au plus des exigences en toxicologie.

Le comportement biologique des 36 alliages commerciaux a été déterminé à priori dans un but bien précis qui était l'obtention du marquage CE selon la Directive Européenne 93/42/CEE [22] entrant en vigueur définitivement le 15 juin 1998. Nous avons donc réalisé les tests suivant les normes ISO 10993-5/EN 30993-5 [69], qui demandent deux tests de cytocompatibilité *in vitro*. Si les résultats obtenus par ces deux tests diffèrent, un troisième doit être ajouté. Afin de mieux déterminer le comportement biologique, nous avons effectué systématiquement quatre tests afin de mieux comprendre les réponses biologiques et de pouvoir éventuellement donner un classement plus précis des matériaux testés.

Le premier test réalisé est celui de prolifération cellulaire. Dans ce test, les cellules sont en contact direct avec les pastilles métalliques. Ce test quantitatif prend en compte de nombreux paramètres comme l'adhésion et la cytotoxicité et représente bien les effets provoqués par un matériau lorsqu'il est implanté dans un organisme. Cette étape nous a permis de remarquer que l'alliage ayant la moins bonne prolifération cellulaire à 3 et 6 jours est l'alliage Cu/Ag/Au (GS 830), celui-ci possède la plus forte teneur en cuivre des 36 alliages de la gamme EC. De faibles proliférations sont également constatées pour des alliages à base Ag/Au contenant du cuivre. Ce phénomène est peut-être dû à un problème d'adhésion et non de cytotoxicité.

Pour mieux trancher, nous réalisons un test de viabilité qui mesure spécifiquement et quantitativement la cytotoxicité d'un composé et permet de classer les substances par la détermination de leur LC50 [29]. Cependant, tous ces alliages étant des alliages à forte teneur en éléments précieux ou semi-précieux, il nous a été possible d'obtenir la LC50 que pour deux alliages, ceci malgré la forte concentration utilisée de 400µg/ml en poudre métallique. Ces deux alliages sont GP700 et GP 830. Le GP 830 qui possède la plus forte teneur en cuivre est donc légèrement cytotoxique. Les faibles résultats de prolifération sont donc certainement liés à cette cytotoxicité. 60% d'or ne permettent certainement pas de limiter la libération des autres constituants comme l'argent, le cuivre, le gallium qui sont reconnus comme étant cytotoxiques. La dissolution du cuivre semble être l'élément décisif. En effet, nous avons pu retrouver 50 fois plus de cuivre (5,1 ppm) que d'argent après 6 jours de culture.

L'alliage GS 700 est plus riche en or (72,5%) mais il contient également la plus forte teneur en zinc (12%) de la gamme EC qui est aussi cytotoxique et fortement réducteur et donc facilement relargué entraînant probablement l'argent et le cuivre lors de sa dissolution. Nous voyons donc apparaître certaines tendances et l'ébauche d'un classement.

Pour mieux apprécier la réponse biologique, nous cherchons à intégrer d'autres paramètres qui se basent sur un critère morphologique, mais cette fois plutôt qualitatif. Pour cela nous cherchons à évaluer l'altération cellulaire au travers de la morphologie cellulaire. Cette évaluation s'effectue sur les cellules adhérentes à leur support métallique par une analyse en Microscopie Electronique à Balayage. Nous remarquons que les cellules sont spontanément orientées suivant les raies de polissage de l'échantillon et qu'elles sont donc extrêmement dépendantes de l'état de surface de l'échantillon [29,63]. Il est également possible de classer les cellules selon trois types de morphologie : normales, légèrement altérées et altérées. Nous remarquons à nouveau que ce sont les alliages contenant une forte teneur en cuivre ou contenant du zinc qui induisent une morphologie altérée ou légèrement altérée à 3 ou 6 jours. Cette tendance est cependant moins marquée.

La toxicité des alliages n'est donc peut-être pas suffisante pour provoquer des altérations cellulaires profondes détectables par la microscopie électronique.

Le dernier test choisi pour la présente étude est un test à la fois morphologique et fonctionnel et également quantifiable, donc spécifique pour l'ensemble de ses indications. Il précise un changement morphologique dans une culture par l'apparition de CGM, qui sont étroitement liées à une altération physiologique voire fonctionnelles des cellules. Ces cellules géantes multinucléées n'apparaissent pas seulement dans les cultures cellulaires ou

organotypiques [116] mais également *in vivo* chez les patients présentant un tatouage à l'amalgame dentaire [16,102] ou porteurs d'implants orthopédiques [47]. Elles sont des constituants caractéristiques des granulomes à proximité des implants. Leur apparition est donc généralement considérée comme une réponse inflammatoire spécifique [16,47,116].

Ce test a été mis au point dans notre Laboratoire [49]. Nous avons pu démontrer une très forte apparition de CGM en culture cellulaire pour le Ni, le Co et l'Ag. Toutefois, les conditions du test, c'est à dire la durée d'exposition et les concentrations utilisées, mettraient les cellules probablement dans un état de stress. Nous avons donc amélioré ce test en diminuant d'abord la durée de 8 à 5 jours, ce qui a réduit la fréquence des CGM dans le témoin de 2,6 à 1,4 %, puisque l'épuisement de milieu de culture n'intervient pas encore à ce temps. De plus, nous avons proposé d'exposer les cellules à des concentrations plus pertinentes, c'est à dire à des concentrations induisant un effet cytotoxique identique.

- Dans le cas de non-cytotoxicité, nous utilisons les plus fortes concentrations (dans notre cas 400 µg/ml).
- Dans le cas où la LC50 est établie, nous appliquons cette concentration comme critère de comparaison.

Par cette méthode, la fréquence de CGM se trouve également diminuée pour les Ni de 16 à 5 % et pour le Co de 20 à 6,5 %. Cette diminution est également atteinte pour les autres métaux ou alliages, tout en respectant la différence significative décrite auparavant.

Cette amélioration a déjà été appliquée dans notre laboratoire à d'autres essais sur des sels et oxydes métalliques [32]. Les résultats obtenus sont tout à fait superposables aux nôtres et valident ainsi le test sous sa forme actuelle. Toutefois, il reste à vérifier et à démontrer si ces cultures riches en CGM en présence de poudres métalliques produisent également des médiateurs pro-inflammatoires comme l'Interleukine 6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) ou le leucotriène B₄ (LTB₄), tel qu'il a été démontré chez des cellules exposées à l'hydroxycarbonate de nickel [3,4].

Grâce aux résultats de ces quatre tests qui précisent un effet de cytotoxicité des alliages, il nous est apparu intéressant d'essayer de regrouper ces résultats et de produire une seule valeur ou indice qui permettrait d'apprécier la cytotoxicité globale de l'alliage et d'en effectuer un classement plus précis.

Pour ceci, nous nous sommes inspirés d'une étude de Seyfert et coll [86,87] à partir de huit tests différents d'hémocompatibilité dans le cadre du Groupe de Travail du Comité Européen de Normalisation CEN/TC 206 et du Comité ISO/TC 194. Ces auteurs ont établi une cotation par points ("score points") qui permet de regrouper tous les tests en un seul indice, afin d'évaluer l'hémocompatibilité globale.

La difficulté à établir un tel classement repose sur l'impact qu'il faut accorder à chaque test et les valeurs critiques de chaque test à partir desquelles l'indice global ne peut plus être calculé. Les auteurs indiquent avoir obtenu de très bons résultats par l'intermédiaire de cette méthode. Nous tentons donc de réaliser un tel classement pour nos tests de cytotoxicité.

Les coefficients affectés à chaque test dépendent essentiellement de leur signification et spécificité: 10 points pour chaque test quantitativement évaluable (prolifération, viabilité,

fonctionnalité) et 4 points pour les tests qualitatifs (morphologie). Nous obtenons donc une cotation sur 44 points.

Pour permettre des comparaisons et l'insertion de nouveaux tests à cet indice, l'échelle est rendue unitaire et l'Indice de Cytotoxicité sera donc compris entre 0 et 100 (100 pour cytotoxique).

A partir de cet index de cytotoxicité, il faudrait établir un barème pour déterminer à partir de combien de points un alliage ou toute autre substance testé peut être classé comme favorable ou doit être considéré comme toxique .

Nous pouvons donc subdiviser l'index de cytotoxicité en classes de toxicité et nous proposons cinq classes différentes que nous appliquons, dans un premier temps, aux alliages précieux et semi-précieux (Tableau 23).

Tableau 23 : Classes de Cytotoxicité.

0 à 20 points :	très bon
21 à 40 points :	bon
41 à 60 points :	moyen
61 à 80 points :	à surveiller
81 à 100 points :	cytotoxique

L'appellation de ces grandes classes doit être considérée comme non définitive, étant donné que nous avons pris comme seul témoin positif le nickel métallique et que nous n'avons pas testé d'autres substances ou matériaux plus toxique comme certains oxydes ou sels métalliques [32,33,44]. D'autres tests et surtout la détermination de matériaux de références toxiques sont donc nécessaires.

Les résultats obtenus sont encourageants et permettent le classement de toute la gamme des 36 alliages. Cependant, les alliages sont de compositions très variées et il est difficile d'imputer une cytotoxicité à un élément plutôt qu'à un autre. Nous pouvons malgré tout essayer d'apprécier les tendances et de les visualiser à l'aide d'une représentation graphique de la composition en fonction de l'indice de cytotoxicité.

On remarque que l'or se retrouve de façon uniforme dans tous les alliages qu'il soit d'indice fort ou faible (pour ce type d'alliages); la présence d'or ne semble donc pas jouer un rôle majeur. L'argent est également réparti uniformément et le palladium se retrouve plutôt dans les alliages à faible index donc avec une bonne cytocompatibilité.

Par contre le cuivre se rencontre majoritairement dans les alliages d'index fort. Les alliages ayant un Index de Cytotoxicité le plus fort sont les alliages Cu/Ag/Au. Les présomptions que nous avons concernant le cuivre et ses éventuels effets néfastes se précisent donc. Il apparaît également que le couplage Cu/Ag/Au n'est pas des plus favorables, du moins en ce qui concerne la cytotoxicité telle qu'elle a été évaluée par les 4 tests de cytotoxicité.

Nous remarquons également que les alliages ayant les plus faibles Index de Cytotoxicité sont plutôt des Pd/Au et Pd/Ag. Cette remarque permet de se positionner sur le plan du palladium qui ne semble pas être un élément qui provoque une cytotoxicité notable car il fait généralement partie de la composition des meilleurs alliages.

Nous remarquons également que l'argent allié au palladium adopte un comportement tout à fait satisfaisant d'une façon générale.

Pour tenter de chiffrer ces tendances nous calculons le coefficient de détermination R^2 entre l'indice de cytotoxicité et un des éléments d'alliage. Ce calcul nous permet d'apprécier l'impact des différents éléments d'alliages sur la réponse biologique. Nous remarquons que pour l'argent et l'or il n'y a absolument aucune tendance, et nous obtenons

pour le palladium $R^2=0,13(+)$,

pour le platine $R^2=0,36(+)$,

pour le cuivre $R^2=0,22(-)$.

Les tendances ne sont donc pas très notables avec cependant un facteur positif pour le palladium et pour le platine, alors que pour le cuivre il est négatif. Ces valeurs sont à prendre à titre indicatif car le reste de la matrice a été considéré comme ayant une réponse constante vis-à-vis de l'Index de Cytotoxicité, or ce n'est pas le cas.

De cette étude des alliages commerciaux, il ressort que le palladium que nous cherchions à évaluer fait partie des meilleurs alliages ainsi que des alliages palladium - argent. Nous avons également remarqué que le cuivre est un élément auquel il serait intéressant de faire attention en ce qui concerne la cytocompatibilité d'un alliage.

Quant au groupe des alliages expérimentaux, nous avons pu mener nos travaux de l'élaboration, via la caractérisation physico-chimique vers l'évaluation biologique.

Rappelons que nous cherchons à établir la composition d'un alliage destiné à une application céramo-métallique avec des caractéristiques optimales tant sur le plan physico-chimique que sur le plan biologique. Comme nous avons pu montrer dans la première partie de notre travail, le palladium est un élément prometteur en ce qui concerne la cytocompatibilité d'un alliage. Cependant, au vu des difficultés rencontrées quant à l'établissement d'une corrélation entre la composition des alliages commerciaux et leur réponse biologique, nous utilisons un calcul statistique par l'intermédiaire d'un plan d'expériences pour nous aider à obtenir une composition qui donnera la réponse optimale en terme de cytocompatibilité. Ce plan nous permet également de limiter le nombre d'expériences nécessaires à l'obtention de cette composition. Pour notre étude, 11 compositions sont nécessaires, auxquelles nous ajoutons arbitrairement un alliage du même domaine qui nous permettra de valider le plan d'expérience. Finalement, deux autres alliages complètent la série, auxquels nous additionnons de l'étain et de l'indium afin de permettre une accroche à la céramique [7]. Tous les alliages expérimentaux sont préparés en pastilles et poudres de la même façon que les alliages commerciaux.

La première étape du travail consiste à vérifier la microstructure des alliages. Nous avons remarqué que les alliages binaires Pd-Ag possèdent une structure dendritique et que l'addition d'or dans ces alliages modifie la structure en atténuant les dendrites, ce qui est un facteur favorable en terme de corrosion [27].

- Les alliages binaires Pd-Cu ont une structure à joints de grains marqués laissent apparaître une légère sous-structure dendritique. L'addition d'or dans ces alliages provoque une augmentation importante de dendrites, d'autant plus marquée que la quantité de Cu est importante. L'addition d'or dans les alliages Pd-Cu ne semble donc pas être un facteur favorable. En absence d'or l'augmentation du taux de Cu dans le Pd ne semble pas affecter la cristallisation.
- Pour les alliages Pd-Cu-Ag, la structure est finement dendritique et très marquée, témoignant d'une corrosion importante. L'addition d'or ne semble avoir aucun impact sur la structure.

De par leur microstructure, nous pouvons répartir les alliages en deux catégories, suivant la présence plus ou moins importante de dendrites:

Bons: E3, E8, MC2, E2, E9.

Moins favorables: E10, E7, M

Les essais électrochimiques réalisés nous permettent d'évaluer la susceptibilité de ces alliages à la corrosion. La méthode de mesure du potentiel d'abandon est peu reproductible et nécessite plusieurs mesures pour établir une moyenne. Le réacteur à 10 mesures nous permet de nous affranchir de ce problème.

Les potentiels les plus élevés se retrouvent pour les alliages les plus riches en Pd ainsi que pour les Pd-Cu. Cela peut s'expliquer par la dissolution du Cu en surface, ce qui permet à l'alliage de se rapprocher du potentiel du Pd pur. Un potentiel élevé ne donne donc pas forcément une garantie de bonne qualité pour l'alliage.

Les potentiels les plus bas sont observés pour les alliages les moins riches en Pd et contenant de l'Ag. Il est possible que l'argent soit moins dissous avec la formation éventuelle d'un film d'AgCl.

Les courbes de polarisation globale nous permettent de déterminer le *potentiel de corrosion* des alliages, la *densité de courant passif* et le *potentiel de rupture* du film de passivation. Ces courbes nous permettent également de constater que la présence d'Ag dans le Pd limite notablement la possibilité de celui-ci à s'hydrogéner [99]. Le pic de formation d'AgCl se trouve également réduit par rapport à celui de l'Ag pur. L'influence de l'Au sur ces alliages Pd-Ag se traduit par un allongement du domaine de passivité, ce qui est un facteur favorable pour ces alliages.

Par contre, la présence de Cu dans le Pd ne limite quasiment pas son hydrogénation. Cependant, malgré la grande susceptibilité du Cu à la corrosion, les alliages Pd-Cu semblent être assez résistants. Le Cu diminue également le pic d'oxydation du Pd et élargit le domaine passif de l'alliage. De plus, la densité de courant passif est très faible. L'ajout d'or dans l'alliage Pd-Cu semble donc plutôt défavorable sur le plan de la corrosion.

En effet, lors de l'étude de la microstructure des alliages, nous avons pu remarquer l'apparition de dendrites consécutive à la présence d'or et certainement due à la formation de phase riche en Au-Cu.

De par les essais électrochimiques, nous pouvons classer les alliages comme suit :

Bons: E2, E9, E3, E8, MC2

Moins favorables: E6, E7, M, E4, E10

Par contre, les alliages Pd-Cu-Ag résistent très mal à la corrosion, avec un domaine passif restreint et avec l'apparition de courants très importants après la rupture du film passif. L'addition d'or dans de tels alliages allonge légèrement le domaine passif, mais ne permet pas d'améliorer notablement la résistance à la corrosion. Ceci peut être expliqué par l'addition d'une trop faible quantité d'or [20].

D'autre part, Suzs [92] souligne le très bon comportement des alliages à base de palladium, même si ces alliages ne contiennent que peu ou pas d'or. Les auteurs indiquent également que pour les alliages conventionnels, le meilleur indice de nobilité se retrouve pour un alliage à teneur en or réduite exempt de cuivre (base Au-Pd-Ag).

Nous remarquons, que la salive artificielle est bien moins agressive que le NaCl 0,9 %, tout au moins en ce qui concerne nos alliages.

L'étude biologique des alliages expérimentaux est conduite avec les mêmes tests et dans les mêmes conditions que pour les alliages commerciaux.

Pratiquement chaque test permet un classement des alliages qui peut être confronté à la composition des alliages. Les résultats de la prolifération cellulaire confirment - plus que le test de viabilité - la moindre cytocompatibilité des alliages les plus riches en Cu.

Quant au test inflammatoire par détermination de la fréquence de CGM, nous constatons que l'Ag pur provoque un effet inflammatoire significativement plus important que le Cu pur. Malgré ceci, ce sont les alliages les plus riches en Cu qui provoquent la plus forte réaction.

Il était donc indispensable d'effectuer des essais de dissolution ionique qui fournissent très clairement l'explication des effets biologiques observés. En effet, c'est le Cu qui est le plus fortement relargué, alors que l'Ag n'est que faiblement libéré dans le milieu. Cette dissolution du Cu et de l'Ag est significativement augmentée dans un milieu biologique (au moins un ordre de grandeur).

Nous avons ensuite appliqué les mêmes barèmes de cotation pour établir l'Index de Cytotoxicité pour les alliages expérimentaux. Si l'on applique donc un classement dans l'ordre de leur cytocompatibilité décroissante nous obtenons pour :

Les meilleurs: MC1,G, MC2, E8, E5

Les moins favorables: E4, E2, E9, E10, E7

On peut comparer ce classement quantitatif avec les appréciations qualitatives données plus haut de par leur microstructure et leur comportement électrochimique, et nous retrouvons certaines superpositions:

pour les meilleurs: E8 et MC2

pour les moins favorables: E7 et E10

mais aussi quelques inversions, comme pour l'alliage M qui a un bon comportement biologique, et les alliages E2 et E9, qui descendent dans le domaine de cytotoxicité.

Pour ces trois derniers alliages se pose donc la question du bon critère d'appréciation: microstructure, corrosion ou cytocompatibilité ?

Pour les alliages E2 et E9, les analyses de dissolution ionique sont un très bon moyen d'interprétation: les deux alliages relarguent assez bien du Cu, et donc corrodent. Quant à l'alliage M, nous n'avons pas d'explication pour son classement très variable.

Enfin, nous avons comparé le classement par l'Index de Cytotoxicité avec la composition des alliages. Il apparaît que presque tous les alliages contenant du Cu se trouvent dans le domaine de cytotoxicité, alors que les alliages Pd-Ag et Pd-Ag-Au se placent dans le domaine de la bonne cytocompatibilité.

Ces observations et comparaisons donnent un intérêt particulier à l'Index de Cytotoxicité qui a été établi avec les alliages commerciaux et qui se trouve validé par ce groupe homogène d'alliages à base de palladium.

De cette étude et par l'intermédiaire de l'Indice de Cytotoxicité, il ressort que le palladium sous sa forme métallique et allié aux alliages dentaires ne présente pas d'effet cytotoxique décelable par nos tests de cytocompatibilité.

De plus, en règle générale et selon Baumel [7], les alliages palladiés approchent les qualités des alliages non précieux quant à leurs propriétés mécaniques, sans en avoir les nombreux inconvénients: coulabilité difficile et défauts de structure, expansion linéaire importante, moindre résistance à la corrosion, manque de ductilité, induction de pigmentation gingivale, sensibilisation des patients provoquant des allergies diverses [48].

Ils conservent les qualités des alliages précieux classiques comme résistance à la corrosion, la coulabilité, la ductilité, sans en avoir les inconvénients: prix et poids élevés, propriétés mécaniques insuffisantes pour réaliser des armatures fines.

7 CONCLUSION

A partir de différents tests biologiques effectués *in vitro* sur une gamme d'alliages dentaires commercialisés, il a été possible d'établir un Index de Cytotoxicité permettant un classement de ces alliages. De ce classement, il nous a été possible de remarquer certaines tendances en fonction de la composition des alliages, et particulièrement que la présence de cuivre dans ceux-ci était un facteur défavorable tout au moins pour les tests biologiques réalisés *in vitro*.

Nous avons également pu constater que la présence de Pd dans ces alliages n'avait pas d'impact particulier sur l'Index de Cytotoxicité. Grâce à une série d'alliages expérimentaux à base de Pd, de Cu, d'Ag et d'Au réalisés dans le cadre d'un plan d'expériences, il nous a été possible de confirmer l'effet défavorable de la présence de cuivre dans l'alliage. Nous avons également remarqué que la présence d'Ag dans le Pd jusqu'à 38 % n'était pas un facteur défavorable; et qu'une addition d'or en faible proportion (de 5%) permet d'améliorer la qualité de l'alliage Pd/Ag. Cependant, il nous a été moins facile de mettre en relation la réponse biologique avec les essais électrochimiques.

Une addition d'étain et d'indium en faible proportion à un alliage dont la réponse est optimale sur le plan biologique ne modifie pas significativement l'Index de Cytotoxicité. Il nous a donc été possible d'établir la composition d'un alliage pour métal-céramique à base de Pd contenant une forte proportion d'Ag tout en possédant une excellente réponse sur le plan biologique.

Les quatre tests décrits précédemment sont donc particulièrement bien adaptés pour rendre compte de la cytotoxicité des alliages métalliques. Cependant ces tests mesurent, *in vitro*, une cytotoxicité à court terme et la prudence s'impose donc pour une extrapolation des résultats à une application clinique à long terme. Pour un alliage ayant passé les tests de cytotoxicité et étant reconnu comme cytocompatible, il est conseillé de vérifier sa biocompatibilité *in vivo* avant toute utilisation clinique. Les tests de cytotoxicité nous serviront à établir un classement préliminaire des alliages et d'en tirer certaines tendances en fonction de leur composition.

8 PERSPECTIVES

Il serait intéressant de réaliser des essais électrochimiques pendant les tests biologiques comme le potentiel d'abandon que prend l'échantillon lorsqu'une culture cellulaire se développe à sa surface.

Ceci permettrait d'obtenir plus facilement une corrélation entre la biologie et l'électrochimie. D'autre part l'étude biologique se restreint à des tests *in vitro* sur des temps très courts (12 jours maximum) ; il serait intéressant de vérifier si les tendances remarquées *in vitro* telles que l'effet néfaste du cuivre peuvent se retrouver *in vivo* avec une circulation de fluides corporels.

D'autre part, très peu d'études ont été menées dans le domaine de la corrosion biologique proprement dite, c'est à dire en présence de bactéries représentatives de la plaque dentaire. Il serait intéressant de déterminer dans un bioréacteur l'influence du Cu, de l'Ag et du Pd sur la flore buccale et la formation du biofilm, pour en tenir compte lors de l'optimisation des alliages dentaires, afin de mieux parer leur altération en milieu buccal souvent très agressif.

Certaines précisions restent à faire sur le plan métallurgique : approfondir l'étude de la microstructure, tant par la microscopie photonique avec des grossissements plus importants que par l'analyse en spectroscopie à énergie dispersive (EDS) pour saisir la répartition des éléments en surface après les essais électrochimiques et surtout après le contact avec le milieu biologique. Une étude RX permettrait également de déterminer les différentes phases présentes dans l'alliage.

Pour valider d'avantage l'Index de Cytotoxicité, il serait particulièrement intéressant d'ajouter d'autres tests spécifiques et quantitatifs de cytocompatibilité déterminant l'influence des métaux sur la fonction et réponse cellulaire. Nous pensons notamment aux tests MTT ou XTT évaluant l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale, les mesures de la lactate déshydrogénase (LDH) donnant des indications spécifiques sur l'intégrité de la membrane cellulaire, et les dosages de l'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire pour obtenir des informations sur la réserve énergétique de la cellule. Il devrait en résulter une proposition aux comités de Normalisation ISO et CEN lors de la prochaine révision des normes existantes.

Dans ce même contexte, la validité du test des CGM devrait être confirmée par des études approfondies concernant l'apparition de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et monokines, si ce test reflète réellement un effet inflammatoire.

9 BIBLIOGRAPHIE

1. ANONYME
Da läuft ein Grossversuch
Der Spiegel, 1993, 7, pp 81-85
2. ARIMOTO S., FUKUOKA S., ITOME C., NAKANO H., RAI H., HAYATSU H.
Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity.
Mutat. Res., 1993, **287**, 293-305.
3. ARSALANE K.
Actions d'un hydroxycarbonate de nickel sur les activités métaboliques et fonctionnelles du macrophage alvéolaire - 223p.
Th : Toxicologie, p 223 : Lille : 1992.
4. ARSALANE K., GOSSET P., HILDEBRAND H.F., VOISIN C., TONNEL A.B. & WALLAERT B.
Nickel hydroxycarbonate induces Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin-6 secretion by alveolar macrophages.
5th.Intern. Conf. Nickel Biochemistry, Toxicology and Ecologic Issues,
Sadbury, Ontario, Canada, 7-11 Sept., 1992
5. BALDI C., MINOIA C., NUCCI A., CAPODAGLIO E., MANZO L.
Effects of silver in isolated rat hepatocytes.
Toxicol. Lett., 1988, **41**, 261-268.
6. BAQUEY C.
Biomatériaux et risques associés.
Dans : Rapport INSERM-ITS. "Recherches sur la sécurité des greffes et thérapies substitutives", juin 1994.
7. BAUMEL S.
Les alliages palladiés en odontologie, Doctorat en Chirurgie Dentaire,
Th : 1994 : Université de Reims, N°0032.
8. BLACK J.
Systemic effects of biomaterials.
Biomaterials., 1984, **5**, 11-18.
9. BARBOSA SV., ARAKI K., SPANGBERG LS.
Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components.
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 1993, **75**, 357-361.

10. BLACKMAN R., GROSS M., SELTZER S.
An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue.
J. Endod., 1989, **15**, 76-79.
11. BRISENO B.M. & WILLERSHAUSEN B.
Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts : 2 Silicone and resin- based sealers.
J. Endod., 1991, **17**, 537-540.
12. BROWN S.S.
Quality assurance : Adrievements, problems, prospects.
In : Trace Elements in Health and Disease
AITIO A., ARO A., JÄRVISALO J., VAINIO H. eds.
Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, (ISBN 0-85186-976-9), 1991, pp 35-48
13. BRUGIRARD J.
Etude du comportement électrochimique des métaux et alliages dentaires
Prélat Édrt, Paris, 1970.
14. BRUGIRARD J., LISSAC M., RECLARU L.
Etat actuel des alliages semi-précieux pour application odontologique : évolution des propriétés chimiques, structurales, électrochimiques et biofonctionnelles.
J. Biomat. Dent., 1986, **2**, 99-115.
15. BRUNE D.
Metal release from dental biomaterials.
Biomaterials., 1996, **7**, 163-175.
16. BUCHNER A., HANSEN L.S.
Amalgam pigmentation (amalgam tatoo) of thé oral mucosa.
A clinicopathologic study of 268 cases.
Oral Surg., **49**, 1980, 139-147.
17. BULDER R., JANSEN J. A.
In vitro cytotoxicity and mutagenicity of dental alloys.
University of Nijmegen Dental School Laboratory of biomaterials, 1995.
18. CARCELLI M., MAZZA P., PELIZZI C., PELIZZI G., ZANI F.
Antimicrobial and genotoxic activity of 2, 6-diacetylpyridine bis (acylhydrazones) and their complexes with some first transition series metal ion. X-ray crystal structure of a dinuclear copper (II) complex.
J. Inorg. Biochem., 1995, **57**, 43-62.
19. CHARNAY R.
Mise au point et caractérisation d'une famille d'alliages semi-précieux (Au, Pd, Ag, Cu) pour prothèses dentaires,
Mémoire CNAM, Lyon, 1985

20. CHARNAY Roland.
Contribution à l'étude des interfaces métal-céramique pour des alliages semi-précieux type Pd-Ag, Pd-Au. - 224p.
Th : Matériaux : Centrale Lyon : 1994 ; 9452.
21. CODINA JC., PEREZ-TORRENTE C., PEREZ-GARCIA A., CAZORLA FM., DEVICENTE A.
Comparison of microbial tests for detection of heavy metal genotoxicity.
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1995, **29**, 260-265.
22. Conseil des Communautés Européennes
Directive 93/42/CEE du Conseil relative aux dispositifs médicaux.
Journal officiel des Communautés Européennes., L169, du 12.7.1993, 43p.
23. COOMBS R. R., GELL P. G. H.
Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease.
In: "Clinical Aspects of Immunology" Gell P. G. H., Coombs R. R. et Lachman P. J. ed,
Blackwell, Scientific Publications, Oxford., 1975, p.761.
24. CRAIG R. G., HANKS C. T.
Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests.
J. Dent. Res., 1990, **69**, 1539-1542.
25. DANSCHER G.
Applications of autometallography to heavy metal toxicology
Pharmacol. Toxicol., 1991, **68**, 414-423.
26. DASCHWOOD RH., BREINHOLT V., BAILEY GS.
Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding *in vivo* and anti-mutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay.
Carcinogenesis., 1991, **12**, 939-942.
27. DE SY Albert., VIDTS Julien.
Traité de métallurgie structurale. – 2^e ed.
Paris : Dunod, 1968. -511p.
28. ECONOMIDES N., KOTSAKI-KOVATSI VP., POULOPOULOS A., KOLOKURIS I., ROZOS G., SCHORE R.
Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues.
J. Endod., 1995, **21**, 122-127.
29. EISENBARTH E.
Einfluss des Vanadium-Gehaltes und der Oberflächenstruktur von Ti-Al-V-Substraten auf die Biocompatibilität und die Zelladhäsion - 223p.
Th : Sciences Naturelles : Saarbrücken : 1997.

30. Encyclopédie Universalis
CD Rom Universalis, 1995, Pd : 18-461, Cu : 6-932, Ag : 2-903, Au : 16-1018
31. FARRAR J.A., LAPPALAINEN P., ZUMFT WG., SARASTE M., THOMSON A.J.
Spectroscopic and mutagenesis studies on the CuA center from the cytochrom-c oxidase complex of *Paracoccus denitrificans*.
European Journal of Biochemistry., 1995, **232**, 294-303.
32. FLOQUET-MASSIN I.
Effets cytotoxiques des métaux entrant dans la composition d'alliages dentaires précieux et semis-précieux. – 275p
Th : Odontologie : Lille : 1999.
33. FRAZIER M.E., ANDREWS T.K.
In vitro clonal growth assay for evaluating toxicity of metals salts.
In : « Trace Metals in Health and Disease »,
Kharasch N., ed, Raven Press, New York, 1979, pp 71-81
34. FREMY M.
Encyclopédie chimique, 1901
35. GADD G. M., LAURENCE O. S., BRISCOE P. A., TREVORS J. T.
Silver accumulation in *Pseudomonas stutzeri* AG259.
Biol. Met., 1989, **2**, 168-173.
36. GENEVRIER M.
Influence de la fonderie sur le comportement électrochimique d'un alliage à base de palladium.
Th : Méd. : LYON I : 1995 ; 042
37. GENTILE JM., GENTILE GJ.
The metabolic activation of 4-nitro-O- phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: the relationship between mutagenicity and antimutagenicity.
Mutat. Res., 1991, **250**, 79-86.
38. Grandes civilisations du passé « Les étrusques ou l'amour de la vie ».
Edition time-life, Amsterdam, 1995, ISBN : 2-7344-0730-2.
39. HAGUENOER J.M., FURON D.
Toxicologie et hygiène industrielle, les dérivés minéraux.
Paris : Technique et documentation, 1982. – 2 vol.,
40. HALL R. E., BENDER G., MARQUIS R. E.
In vitro effects of low intensity direct current generated silver on eukaryotic cells.
J. Oral Maxillo. Surg., 1988, **46**, 128-133.
41. HANSON M., PLEVA J.
The dental amalgam issue. A review.
Experimentia., 1991, **47**, 9-22.

42. HARTMAN Z., HARTMAN P.E.
Copper and Cobalt complexes of carcinosine and anserine: production of active oxygen species and its enhancement by 2-mercaptoimidazoles.
Chem. Biol. Interact., 1991, **84**, 153-168.
43. HILDEBRAND H.F.
Sécurité des implants métalliques.
Dans : Rapport INSERM-ITS. "Recherches sur la sécurité des greffes et thérapies substitutives", juin 1994.
44. HILDEBRAND H.F., COLLYN-D'HOOGHE M., SHIRALI P., BAILLY C., KERCKAERT J-P.
Uptake and biological transformation of β NiS and α Ni₃S₂ by human embryonic pulmonary epithelial cells (L132) in culture,
Carcinogenesis, 1990, 11, 1943-1950
45. HILDEBRAND H. F., LEFEVRE A., ELAGLI K., VERON C.
Revue bibliographique sur les effets toxiques et allergiques du palladium.
Le Chirurgien Dentiste de France., 1993, **677**, 57-63.
46. HILDEBRAND H.F., A. LEFEVRE, K. ELAGLI, C. VERON.
In vitro studies on the cell viability and inflammatory effects induced by dental alloys and pure reference metals.
In : Proceedings of the Symposium: "Biocompatibility, Allergies and Resistance to Corrosion: a global scientific approach", Neuchâtel, Suisse, 1993, 11-19.
47. HILDEBRAND H.F., OSTAPCZUK P., MERCIER J.F., STOEPLER M. , ROUMAZEILLE B. & DECOULX J.
Orthopaedic implants and corrosion products.
In : Biocompatibility of Co-Cr-Ni alloys, Hildebrand H.F. & Champy M. eds., NATO-ASI Series A., Plenum, London, New-York, **158**, 1988, pp 133-153
48. HILDEBRAND H. F., VERON C., HERLANT-PEERS M. C., FERNANDEZ J
Les conséquences biologiques de la présence d'ions métalliques dans la cavité buccale.
R. Ondon. Stomatologie., 1994, **Tome XIII n°1**.
49. HILDEBRAND H.F., FLOQUET I.; LEFEVRE A., VERON C.
Biological and hepatotoxic effects of palladium. An overview on experimental investigations and personal studies.
Int. J. Risk Safety Med., 1996, **8**, 149-167.
50. HOLBROOK D.J., Jr, WASHINGTON M.E., LEAKE H.B. & BRUBAKER P.E.
Studies on the evaluation of the cytotoxicity of various salts of lead, manganese, platinum and palladium.
Environm. Health Persp., 1975, **10**, 95-101

51. HOLBROOK D.J., WASHINGTON M.E., LEAKE H.B. & BRUBAKER P.E.
Effects of platinum and palladium salts on parameters of drug metabolism in rat liver.
J. Toxicol. Environm. Health., 1976, **1**, 1067-1079
52. HUSSAIN S., ANNER R. M., ANNER BM.
Cysteine protects Na, K-ATPase and isolated human lymphocytes from silver toxicity.
Biochem Biophys Res Commun., 1992, **189**, 1444-1449.
53. IIJIMA S.
Histopathological study of the effect of pure metals to the periodontal tissues.
Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi., 1989, **31**, 997-1020.
54. IVANOV A. I. U., FOMCHENKOV V. M.
Electrophysical analysis of *Escherichia coli* cell damage caused by silver ions.
Mikrobiologiya., 1992, **61**, 464-71.
55. JANSEN B., RINCK M., WOLBRING P., STROHMEIER A., JAHNS T.
In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy and biocompatibility of silver-coated central venous catheter.
J. Biomater. Appl., 1994, **9**, 55-70.
56. KAGA M., SEALE N. S., HANAWA T., FERRACANE J. L., WAITE D. E., OKABE. T.
Cytotoxicity of amalgams, alloys, and their elements and phases.
Dent Mater., 1991, **7**, 68-72.
57. KAZIMOV M. A.
The metabolic interaction of cobalt and silver in the body during their combined action.
Gig. Tr. Prof. Zabol., 1992, **11-12**, 23-27.
58. KIERANS M., STAINES A. M., BENNETT H., GADD G. M.
Silver tolerance and accumulation in yeasts.
Biol. Meta., 1991, **4**, 100-106.
59. LANDOLT D.
Traité des matériaux 12, corrosion et chimie de surfaces des métaux.
Paris :1993: Presses polytechnique et universitaires romandes ; 516p.
60. LANGER R.. CIMA L.G.. TAMADA J.A.. WINTERMANTEL E.
Future directions in Biomaterials.
Biomaterials., 1990, **11**, 738-745.
61. Le microscope confocal.
Pour la Science, 1994, **204**, 62-67.
62. LIEDBERG H., LUNDEBERG T.
Assesment of silver-coated urinary catheter toxicity by cell culture.
Urol. Res., 1989, **17**, 359-60.

63. LINEZ-BATAILLON P., MONCHAU F., ANSELME K., BIGERELLE M., BEAUVILLAIN J.C., HILDEBRAND H.F.
Adhésion de cellules osseuses et état de surface des implants. Etude *in vitro* de l'adhésion d'une lignée de cellules osseuses de souris MC3T3-E1 sur des échantillons d'un alliage de titane (TiAL6V4) de cinq rugosités différentes.
ALPHA OMEGA News, 1998, 41-Nov, pp 11-13
64. LIU J., KERSHAW W. C., KLAASSEN C. D.
The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 1991, 107, 27-34.
65. MAZEMAN M.
Conception d'un os artificiel en céramique pour la chirurgie réparatrice de la main.
Rapport Université de Technologie de Compiègne. Lille, 1994.
66. MOORE B.K. et OSHIDA Y.
Materials Science in Dentistry,
In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, D.L. Wise et al. eds,
Marcel Dekker, Inc., New York, 1995, pp 1325-1431
67. MUELLER J. C.
Binding of corroded ions to human saliva.
Biomaterials., 1985, 6, 146-149.
68. NAITO S., ONO Y., SOMIYA I., INOUE S., ITO K., YAMAMOTO K., KAWANISHI S.
Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites.
Chem. Res. Toxicol., 1994, 310, 79-88.
69. Norme ISO 10993-5 (EN 30993-5, NF S 99-505).
Evaluation biologique des dispositifs médicaux,
Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité : Méthodes *in vitro*., 1994, 7p.
70. Norme NF S 91-141.
Biodégradabilité des alliages métalliques utilisés en art dentaire.
Normalisation d'essais électrochimiques., 1997, 17p.
71. Norme ISO 10271
Dental metallic materials – Corrosion test methods., 1997.
72. PASCAL P.
Nouveau Traité de Chimie Minérale. Tome XIX.
Paris : Masson : 1958.
73. PASCAL P.
Nouveau Traité de Chimie Minérale. Tome III,
Paris : Masson : 1958.

74. PISTOOR Fh., KAPSENBERG ML., BOS JD., MEINARDI MM., VONBLOMBERG ME., SCHEPER RJ.
Cross-reactivity of human nickel-reactive T-lymphocyte clones with copper and palladium.
J-Invest-Dermatol., 1995, **105**, 92-95.
75. PUCK T.T. et MARKUS P.I.
A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X irradiated cells to supply conditioning factors,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1955, **41**, 432-437.
76. PRINCE A., RAYNOR G.V., EVANS D.S.
Phase diagrams of ternary gold alloys, 505p.
The Institute of Metals : ISBN 0-904357-50-3.
77. QUADRI A., AHMAD M.
Steroïd induced single strand breaks in DNA mediated by active oxygen species and its biological consequences.
Biochem. Mol. Biol. Int., 1993, **29**, 499-510.
78. ROH JH., TAKENAKA Y., SUZUKI H., YAMAMOTO K., KUMAGAI H.
Escherichia coli K-12 copper-containing monoamine oxidase: investigation of the copper binding ligands by site-directed mutagenesis, elemental analysis and topa quinone formation.
Biochem.Biophys.Res .Commun., 1995, **212**, 1107-1114.
79. ROMAGUERA C., GRIMALT F. & VILAPLANA J.
Contact dermatitis from nickel : an investigation of its sources.
Contact Dermatitis, 1988, **19**, 52-57.
80. RUNGBY J.
An experimental study on silver in the nervous system and on aspects of its general cellular toxicity.
Dan. Med. Bull., 1990, **37**, 442-449.
81. RUNGBY J., ERNST E.
Experimental induced lipid peroxidation after exposure to chromium, mercury or silver interactions with carbons tetrachloride.
Pharmacol. Toxicol., 1992, **70**, 205-207.
82. SAYATO Y., NAKAMURO K., UENO H., GOTO R.
Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water.
Mutat.Res., 1993, **300**, 207-213.
83. SCHEDLE A., SAMORAPOOMPICHIT P., RAUSCH-FAN XH., FRANZ A., FUREDER W., SPERR WR., SPERR W., ELLINGER A., SLAVICEK R., BOLTZ-NITULESCU G.
Reponse of L-929 fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations.
J. Dent. Res., 1995, **74**, 1513-1520.

84. SHINOGI M., MAEIZUMI S.
Effect of preinduction of metallothionein on tissue distribution of silver and hepatic lipid peroxydation.
Biol. Pharm. Bull., 1993, **16**, 372-374.
85. SCHWEIKL H., SCHMALZ G., STIMMELMAYR H., BEY B.
Mutagenicity of AH26 in an *in vitro* mammalian cell mutation assay.
J. Endod., 1995, **21**, 407-410.
86. SEYFERT U.T., MÖRSDORF S., RIGGERT J. & JUNG F.
Hemocompatibility testing. Biochemische Analytik der Hämokompatibilität
Clin. Lab. 1997, **43**, 571-582.
87. SEYFERT U.T., RIEDEL W. & JUNG F.
In vitro Hämokompatibilitätstestung von Koronarstents.
In : Aktuelles aus der Klinischen Mikrozirkulation und Hämorheologie
JUNG F., AKA eds., Homburg, 1998, pp 281-289.
88. SLAWSON R. M., LOHMEIER VOGEL E. M., LEE H., TREVORS J. T.
Silver resistance in *Pseudomonas stutzeri*.
Biometals, 1994, **7**, 30-40.
89. SOCRANSKY S., MANGANIELLO S.
The oral microbia of man from birth to senility.
J. Periodont., 1977, **42**, 485-494.
90. SPENO H., TAHERI M.R., SIEBURTH D., MARTIN CT.
Identification of essential amino acids within the proposed CuA binding site in subunit II of Cytochrome-c oxidase.
Journal of Biological Chemistry., 1995, **270**, 25363-25369.
91. STEA S., SAVARINO L., CIAPETTI G., GENNI E., STEA S., TROTTA F., MOROZZI G., PIZZOFERRATO A.
Mutagenic potential of root canal sealers: evaluation through Ames testing.
J. Biomed Mater. Res., 1994, **28**, 319-328.
92. SUSZ C.P., TIECHE Y., MEYER J.M., GODIN C.
Résistance à la corrosion des alliages dentaires. L'indice de nobilité IN.
J. Biomat. Dent., 1992, **7**, 5-14.
93. SWANGER J.E., DOLAN P.M., ZWEIER J.L., KUPPUSAMY P., KENSLER T.W.
Role of benzoyloxy radical in DNA damage mediated by benzoyl peroxyde.
Chem. Res. Toxicol., 1991, **4**, 223-228.
94. SZYBA K., GOLONKA MC., GASIOROWSKI K., URBAN J.
Mutagenic activity of copper (II) chromate and dichromate complexes with polypyridines.
Biometals., 1992, **5**, 157-161.

95. TAKEDA S., KOSUGI H., TAKIMOTO T., TSUTSUMI N., NAKAMURAM.
Corrosion behavior of Ag-Pd binary alloys under dynamic conditions and its cytotoxicity (*in vitro*).
Shika Zairyo Kikai., 1990, **9**, 825-30.
96. TAOKA Y.
Cytotoxicity of dental filling materials in primary cultured cells derived from human ental pulp (*in vitro*).
Shika Zairyo Kikai., 1989, **8**, 763-782.
97. TONOUCHI T.
Effects of sealing of dentinal tubules of root canal wall with Ag (NH₃)₂F (3.8%) solution.
Gifu Shika Gakkai Zasshi, 1989, **16**, 57-79.
98. TKESHELASHVILI L.K, Mc BRIDE T., SPENCE K., LOEB L.A.
Mutation spectrum of copper-induced DNA damage.
J. Biol. Chem., 1991, **266**, 6401-6406.
99. TRAISNEL M., ROCHER P., HILDEBRAND H.F., BREME J., LEROY J.M.
Influence of the alloy composition on the crevice corrosion behaviour.
Innov. Tech. Biol. Med., 1998, in press
100. VASISHTA R., SAXENA M., CHHIBBER S.
Contribution of silver ion resistance to the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to burn wound sepsis.
Folia Microbiol. Praha., 1991, **36**, 498-501.
101. VASISHTA R., SAXENA M., CHHIBBER S.
Heavy metal resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.
Folia Microbiol. Praha., 1989, **34**, 448-452.
102. VERON C., HILDEBRAND H.F., FERNADEZ J.P.
Les pigmentations gingivales par l'amalgame dentaire. Etude ultrastructurale.
J. Biol. Buccale, 1984, **12**, 273-286.
103. VERON C., HILDEBRAND H.F.& FERNADEZ J.P.
Les pigmentations gingivales par l'amalgame dentaire : étude ultrastructurale et microanalyse.
J. Biomat. Dent. 1985, **1**, 47-52
104. VERON C., HILDEBRAND H. F., MARTIN P.
Amalgames dentaires et allergie.
Jour. Biol. Buccale, 1986, **14**, 83-100.
105. WATAHA J. C., CRAIG R. G., HANKS C. T.
The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium.
J. Dent. Res., 1991, **70**, 1014-1018.

106. WATAHA J-C., HANKS C.T., CRAIG R.G.
The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloys.
Dent. Mater., 1993, **9**, 172-176.
107. WATANABE K.
Histopathological study of damage to periodontal tissues by silver alloy metals in rats
Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi, 1989, **31**, 1021-1046.
108. WELLS TN., SCULLY P., PARAVICINI G., PROUDFOOT AE., PAYTON MA.
Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ion and flomazine.
Biochemistry, 1995, **34**, 7896-7903.
109. WILLIAMS D.F.
Definitions in biomaterials.
Dans : "Progress in biomedical engineering". D.F. Williams. Éd. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 1987, **vol.4**.
110. YAMADA H., KOIZUMI S.
Metallothionein induction in human peripheral blood lymphocytes by heavy metals.
Chem. Biol. Interact., 1991, **78**, 347-354.
111. YAMAMOTO K., INOUE S., KAWANISHI S.
Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu²⁺ role of active oxygen species.
Carcinogenesis, 1993, **14**, 1397-1401.
112. YOSHIOKA S.
Dissolution of silver-based alloys under dynamic conditions and its relation to cytotoxicity (*in vitro*).
Shika Zairyo Kikai., 1989, **8**, 324-336.
113. YUN CH., JEONG HG., JHOUN JW., GUENGERICH FP.
Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes.
Carcinogenesis., 1995, **16**, 1437-1440.
114. YURIKU U, MASATOSHI M
Mutagenic activity of some platinum and palladium complexes.
Mutation research, 1993, **298** : 296-275.
115. ZHOU Y.
Herstellung und Charakterisierung von Verbundwerkstoffen aus biokompatiblen Titanlegierungen mit bioaktiver Hydroxylapatitkeramikschiicht.
Th : Saarbrücken : 1994.
116. ZIATS N.P., MILLER K.M. & ANDERSON J.M.
In vitro and *in vivo* interactions of cells with biomaterials. Biomaterials, 1988, **9**, 5-13.

TABLEAUX

Tableau 1 : Patients sensibilisés au Pd.	21
Tableau 2 : Le palladium.	38
Tableau 3 : L'argent.	41
Tableau 4 : Le Cuivre.	45
Tableau 5 : L'or.	47
Tableau 6 : L'étain.	49
Tableau 7 : L'indium.	49
Tableau 8 : Récapitulatif des travaux antérieurs concernant les transformations structurales rencontrées dans les alliages précieux et semi-précieux [20].	58
Tableau 9 : Les différentes formes de corrosion.	63
Tableau 10 : Composition massique (%)des alliages de la game EC.	71
Tableau 11 : Composition retenue pour effectuer les essais biologiques.	73
Tableau 12 : Composition de la salive artificielle.	83
Tableau 13 : Conditions physico-chimiques établies pour les essais électrochimiques.	84
Tableau 14 : Prolifération de Fibroblastes NIH 3T3 en contact direct avec les pastilles d'alliages commerciaux (n=6).	90
Tableau 15 : Effet relatif de clonage (ERC% ± SD) des cellules L132 clonées en présence continue de 400 µg/ml de poudre des alliages de la gamme EC.	95
Tableau 16 : Fréquence d'apparition des Cellules Géantes Multinucléées sur une population moyenne de 800 cellules (base) sous l'action de 400µg/ml de poudre métallique (n=10).	105
Tableau 17 : Barème de cotation (/ 44).	107
Tableau 18 : Récapitulatif de la composition et des résultats biologiques obtenus sur les alliages commerciaux de la gamme EC, établissement d'une cotation et d'un index de cytotoxicité (I.C.).	112
Tableau 19 : Dureté Vickers des alliages expérimentaux.	126
Tableau 20 a : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages expérimentaux (n=6).	138
Tableau 21 : Récapitulatif des compositions et des résultats biologiques obtenus sur les alliages expérimentaux et application de l'Index de Cytotoxicité (I.C.).	146
Tableau 22 : Résidu de la réponse.	151
Tableau 23 : Classes de Cytotoxicité.	166

FIGURES

Figure 1 : Bridge étrusque[38].....	15
Figure 2 : Crâne de femme étrusque portant un bridge [38].....	15
Figure 3 : Diagramme de Pourbaix du Pd.....	39
Figure 4 : Diagramme binaire Ag-Pd.....	51
Figure 5 : Diagramme binaire Cu-Pd.....	52
Figure 6 : Diagramme binaire Au-Pd.....	52
Figure 7 : Diagramme binaire Ag-Au.....	53
Figure 8 : Diagramme binaire Ag-Cu.....	53
Figure 9 : Diagramme binaire Au-Cu.....	54
Figure 10 : Diagramme ternaire du liquidus Ag-Au-Pd (at.%) [78].....	55
Figure 11 : Diagramme ternaire du solidus Ag-Au-Pd (at.%) [78].....	55
Figure 12 : Diagramme ternaire Au-Ag-Cu liquidus (at.%) [78].....	56
Figure 13 : Diagramme ternaire Au-Ag-Cu 350 °C (at.%) [78].....	56
Figure 14 : Diagramme ternaire Au-Cu-Pd liquidus (at.%) [78].....	57
Figure 15 : Diagramme ternaire Au-Cu-Pd 350 °C (at.%) [78].....	57
Figure 16 : La cristallisation dans un lingot.....	60
Figure 17 : Contraintes en composition imposées par le cahier des charges sur alliages Pd-Cu-Ag-Au.....	72
Figure 18 : Polyèdre de composition permise par le cahier des charges.....	73
Figure 19 : Micrographie sur bridge de l'alliage EC 720 (X 200).....	74
Figure 20 : Micrographie du barreau en alliage EC 720 coulé à la cire perdue (X200).....	75
Figure 21 : Micrographie du barreau en alliage EC 720 coulé dans une lingotière métallique (X200).....	75
Figure 22 : Cycle de cuisson céramique Ivoclar.....	76
Figure 23 : Dimension des poudres métalliques caractérisée au MEB.....	77
Figure 24 : Principe du microscope confocal [63].....	79
Figure 25 : Profil obtenu par microscopie confocale LASER d'un échantillon métallique poli sur papier SiC au grade 1200.....	79
Figure 26 : Bioréacteur.....	84
Figure 27 : Electrode double : de travail et de Pt.....	85
Figure 28 : Prolifération de fibroblastes NIH 3T3 en contact direct avec les pastilles d'alliages commerciaux (n=6).....	91
Figure 29 : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique (n=6).....	92
Figure 30-A: Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre métallique provenant des alliages commerciaux (n=6).....	93
Figure 31 : Effet relatif de clonage (ERC% ± SD) des cellules L132 clonées en présence continue de 400 µg/ml de poudre des alliages de la gamme EC.....	96
Figure 32 : Effet relatif de clonage (ERC% ± SD) des cellules L132 clonées en présence continue de 400 µg/ml de poudre d'alliages et de métaux purs.....	97
Figure 33 : Orientation macroscopique du tapis cellulaire suivant les stries de polissage unidirectionnelles de l'échantillon (diamètre de la pastille = 15 mm).....	98
Figure 34 : Orientation microscopique des cellules NIH 3T3 suivant les stries de polissage unidirectionnelles de l'échantillon métallique (MEB, X2000).....	99
Figure 35 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 cultivé sur du verre borosilicate (contrôle). On remarque la présence de nombreux spicules et évagination de la surface cellulaire, ce qui témoigne d'une bonne activité cellulaire.....	101
Figure 36 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 normal cultivé sur un alliage précieux ou semi-précieux. Les spicules et les évaginations de la membrane cellulaire sont comparables à celles des cellules témoin.....	101
Figure 37 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 légèrement altéré par le support métallique avec disparition des spicules.....	102
Figure 38 : Morphologie caractéristique d'un fibroblaste NIH 3T3 altéré avec lyse de la membrane cellulaire.....	102
Figure 39 : Morphologie caractéristique d'une cellule géante multinucléée dans une culture témoin de cellules épithéliales L132.....	103
Figure 40 : Vue d'ensemble d'une culture de cellules L132 témoin. Noter la présence de quelques cellules binucléées (flèches).....	104

Figure 41 : Vue d'ensemble d'une culture de cellules L132 en présence d'une poudre de Ni. Noter la présence de plusieurs cellules géantes multinucléées et de cellules vacuolisées. Ces dernières témoignent d'un effet cytotoxique.	104
Figure 42 : Fréquence d'apparition des Cellules Géantes Multinucléées sur une population moyenne de 800 cellules (n=10).	106
Figure 43 : Classement des alliages commerciaux par Indice de Cytotoxicité (I.C.)	109
Figure 44 : Classement des alliages commerciaux selon l'Indice de Cytotoxicité.	111
Figure 45 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Pd (en ‰).	113
Figure 46 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Cu (en ‰).	113
Figure 47 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Ag(en ‰).	114
Figure 48 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Au (en ‰).	114
Figure 49 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Pt (en ‰).	114
Figure 50 : Répartition des alliages en fonction de leurs micrographies.	118
Figure 51 : Micrographie de l'alliage E1 (X200).	118
Figure 52 : Micrographie de l'alliage E5 (X200).	119
Figure 53 : Micrographie de l'alliage E3 (X200).	119
Figure 54 : Micrographie de l'alliage E8 (X200).	120
Figure 55 : Micrographie de l'alliage MC1 (X200).	121
Figure 56 : Micrographie de l'alliage MC2 (X200).	121
Figure 57 : Micrographie de l'alliage E2 (X200).	122
Figure 58 : Micrographie de l'alliage E9 (X200).	122
Figure 59 : Micrographie de l'alliage E4 (X200).	123
Figure 60 : Micrographie de l'alliage E10 (X200).	123
Figure 61 : Micrographie de l'alliage E6 (X200).	124
Figure 62 : Micrographie de l'alliage E7 (X200).	124
Figure 63 : Micrographie de l'alliage G (X200).	125
Figure 64 : Micrographie de l'alliage M (X200).	125
Figure 65 : Evolution de la dureté Vickers en fonction du rayon de la pastille (La dureté augmente du centre vers la périphérie).	126
Figure 66 : Localisation des prises de dureté (1-6).	126
Figure 67 : Duretés comparatives entre les alliages commercialisés et les alliages obtenus avec la méthode de préparation artisanale (c.c. : cuisson céramique).	127
Figure 68 : Courbes de polarisation globale cyclique de G dans du NaCl à 0,9% et dans la salive artificielle, pH 6,7.	129
Figure 69 : Potentiel d'abandon obtenu avec le réacteur 10 mesures dans une solution de NaCl 0,9%.	130
Figure 70 : Potentiel d'abandon dans une solution de NaCl 0,9%.	131
Figure 71 : Polarisation globale du Pd, Ag, E1 (NaCl 0,9%).	132
Figure 72 : Courbe de polarisation globale de Cu, Pd, E2 (NaCl 0,9%).	134
Figure 73 : Courbe de polarisation globale de Cu, Pd, E2 (NaCl 0,9%).	134
Figure 74 : Prolifération cellulaire.	137
Figure 75 : Viabilité cellulaire.	142
Figure 76 : Morphologie d'un fibroblaste NIH 3T3 sur un échantillon de cuivre.	143
Figure 77 : Morphologie d'un fibroblaste NIH 3T3 sur un échantillon d'argent.	143
Figure 78 : Apparition de Cellules Géantes Multinucléées dans des cultures de cellules L132.	145
Figure 79 : Analyse par ICP de la dissolution des alliages expérimentaux dans l'eau (ppb)	148
Figure 80 : Analyse par ICP de la dissolution ionique des alliages dans des milieux de cultures cellulaires (ppb).	150
Figure 81 : Courbes d'isoreponse de prolifération cellulaire (0% Cu).	153
Figure 82 : Courbes d'isoreponse de prolifération cellulaire (12.5% Cu).	154
Figure 83 : Courbes d'isoreponse de prolifération cellulaire (25% Cu).	155
Figure 84 : Droite de régression linéaire entre l'indice de cytotoxicité et la quantité de Pd, Cu, Ag, Au, contenu dans les alliages (en ‰ w/w).	158
Figure 85 : Présentation graphique des coefficients de corrélations (R) obtenus entre la quantité des métaux dans l'alliage et la concentration en ions dissous dans le milieu de culture (colonnes).	159
Figure 86 : Classement des alliages expérimentaux en fonction de leur Index de Cytotoxicité.	161

