

Chapitre III :
Evaluation d'un biomatériau

I- Introduction

Le substitut osseux idéal est un biomatériau ayant des propriétés mécaniques proches de l'os, pouvant être à la fois sûr, efficace et disponible.

La sécurité d'un biomatériau repose sur la qualité de sa reproductibilité, sur sa biocompatibilité et sur l'absence de toxicité de ce biomatériau ainsi que ses produits de dégradation. L'évaluation de cette sécurité est essentielle et doit être effectuée avant l'étape de l'évaluation de sa biofonctionnalité chez l'animal.

L'**efficacité** d'un substitut osseux repose sur les **résultats cliniques à court, moyen et long termes**.

Cependant, l'étude de sa bioactivité, de ses qualités d'ostéoconduction, d'ostéoinduction et d'ostéoformation est essentielle car les résultats vont être prédictifs de l'efficacité clinique.

En plus, il faut qu'il puisse être fabriqué en **quantité suffisante** pour répondre à toutes les demandes et qu'il puisse **se conserver suffisamment longtemps sans dégradation significative** de ses propriétés essentielles et que ses conditions de conservation soient les plus simples, à la portée de tout service de chirurgie osseuse.

Le choix d'un biomatériau pour une utilisation en tant que matériaux de comblement osseux, dépend d'un ensemble de paramètres et de critères fixés selon le domaine d'application (âge, site,) et le but recherché.

II- Tests « in vitro »

1- Intérêts des tests *in vitro*

La double capacité d'un biomatériau à **relarguer** des concentrations adéquates de certaines **espèces ioniques** et à former à sa surface une couche d'HA lors du contact avec des fluides biologiques synthétiques, permet d'évaluer *sa faculté à se lier aux tissus vivants*.

Les tests *in vitro*, peu coûteux et faciles à mettre en œuvre, constituent une **approche préliminaire du comportement d'un biomatériau**. Ils permettent de donner une **première évaluation de la bioactivité** des matériaux. Si les matériaux étudiés présentent des propriétés intéressantes, cette étude sera alors complétée par des tests *in vitro* en présence de cellules, puis des tests *in vivo*.

2- Tests à l'absence des cellules

Les tests de bioactivité « *in vitro* », à l'absence des cellules, s'effectuent par immersion des échantillons (soit pastilles ou poudres) dans des liquides physiologiques.

Les solutions les plus utilisées sont:

le liquide physiologique simulé (**SBF**: simulated body fluid) et la solution physiologique riche en P (**PBS**: phosphate buffered solution).

Pour s'approcher des conditions physiologiques; on place les flacons (matériau +SBF (ou PBS)) dans un **incubateur** réglé à **37°C** avec une agitation circulaire de **50 tours/min**.

SBF est une solution physiologique qui a une composition ionique très proche de celle du plasma sanguin humain (tableau 1). Elle se prépare selon le protocole proposé par Kokubo, en ajustant son pH à 7.4.

Concentrations ioniques (mmol.L⁻¹)

	Na⁺	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺	Cl⁻	HCO₃⁻	HPO₄²⁻
Plasma sanguin	142	5	2.5	1.5	103	27	1
SBF	142	5	2.5	1.5	148.8	4.2	1

PBS est une solution très riche en P, Il s'agit d'un soluté physiologique contenant NaCl, Na₂HPO₄, KCl et KH₂PO₄.

composé	NaCl	Na₂HPO₄	KCl	KH₂PO₄
Concentration	0,17M	10mM	3,3mM	1,8mM

3- Les tests in vitro à la présence des cellules

Les biomatériaux placés en contact avec des tissus vivants peuvent être à l'origine des effets toxiques provoqués par le matériau lui-même ou par ses produits de dégradation sur les cellules par contact direct ou indirect. L'étude de cytotoxicité, avec l'utilisation de techniques de culture cellulaire, permet ainsi de déterminer la lyse cellulaire (mort cellulaire), l'inhibition de la croissance cellulaire et les autres effets sur les cellules engendrés par les matériaux ou leurs extraits.

La cytotoxicité est la propriété qu'un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

Il existe trois grands groupes de méthodes d'études de la cytotoxicité :

- les méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire,**
- les méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire (les cellules se multiplient rapidement et en abondance),**
- les autres méthodes.**

Les méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire sont les plus nombreuses et les plus employées. On distingue 2 types de méthodes fondées sur:

- l'utilisation de colorants,**
- le "relargage" de molécules biologiques dans le milieu extérieur.**

Méthodes de cytotoxicité utilisant des colorants

Principe : utilisation d'un colorant qui, en fonction de ses caractéristiques, pénètre dans les cellules vivantes ou mortes.

La proportion relative des cellules colorées ou non est un reflet exact du nombre de cellules vivantes ou mortes et donc de la viabilité de l'ensemble de la population cellulaire, en relation directe avec la concentration du toxique étudié.

Méthodes de cytotoxicité basées sur l'altération de la prolifération cellulaire

Tout toxique, en tuant les cellules ou en bloquant le cycle cellulaire, diminue la prolifération de l'ensemble de la population.

On distingue 2 grands groupes de méthodes :

- **les méthodes de numération**, qui consiste à dénombrer les cellules à l'aide d'un compteur de particule (compteur "Coulter") ou par observation au microscope.

- **les méthodes biochimiques**, basées sur la détermination semi-quantitative des principaux constituants intracellulaires tels que l'ADN et les protéines, qui sont le reflet du nombre de cellules totales.

Autres méthodes de cytotoxicité

Les autres méthodes, à titre d'exemple, nous citons:

- Méthodes morphologiques,
- Méthodes de pH-métrie quantifiant les modifications du pH du milieu dû à l'arrêt de libération du CO₂ généré par l'activité respiratoire des cellules,
- Méthodes basées sur la détermination quantitative de la charge cellulaire globale en ATP(adénosine-5'-triphosphate), excellent paramètre de viabilité et de croissance cellulaire,
- Mesures du taux de glutathion réduit (tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique),
- Quantification du Ca cytosolique qui apporte des éléments d'information sur les mécanismes précoces d'apparition de la cytotoxicité.

L'adénosine-5'-triphosphate (ATP) est la molécule qui, dans la biochimie de tous les organismes vivants connus, fournit par hydrolyse l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme.

III- Tests in vivo

L'implantation dans un corps animal se réalise par un chirurgien. On expérimente sur un lot d'animaux avec différents délais (suivre le métabolisme). Ces tests sont coûteux (chirurgien et lot d'animaux). On commence sur un petit animal et ensuite on passe au plus gros (rat → lapin → mouton ou porc).

Ces tests consistent à étudier les propriétés histologiques et physico-chimiques du matériau élaboré après implantation chez une espèce animale donnée.

En général, les sites d'implantation sont :

- **Crane (sous forme de poudre).**
- **Fémur (au niveau de l'os spongieux) : tête de fémur.**
- **Tibia (au niveau de l'os cortical).**

S'il y'a beaucoup de sollicitations mécaniques, on réalise le test en os cortical.

Par contre si le matériau est destiné à une implantation en maxillo-faciale, on réalise le test en os spongieux.

Les extractions de prélèvements sont réalisées au court du temps après implantation pour suivre l'évolution du matériau au niveau biologique et physico-chimiques (prélèvements à : 15 jours, 1, 3, 6, et 9 mois).

Chaque prélèvement est coupé en 2 parties :

- Une partie destiné à l'histologie.**
- une partie destinée aux études physico-chimiques.**

Il faut déterminer la cinétique de formation de l'os néoformé à la surface du biomatériau après un certain temps d'implantation.

Remarque

Après implantation et prélèvement, le matériau est **précieux**, il faut le manipuler avec précaution, car on a une très faible quantité : il faut privilégier des analyses non destructives.

Pour chaque délai après implantation, on réalise des études physico-chimiques (RX, IR, RMN, analyse thermique,.....).

Les résultats obtenus seront comparés aux propriétés du matériau avant expérimentation « in vivo ».

IV-Les essais cliniques

Ils sont réalisés chez l'homme après avis du comité départemental d'éthique.

Ils sont initiés par un « promoteur », réalisés en clinique par un « investigateur » et les résultats sont vérifiés par un « moniteur » indépendant.

V- AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES TESTS IN VITRO ET DES TESTS IN VIVO

1- Les tests *in vitro*

● *avantages*

- plus rapides que les tests *in vivo*.
- moins onéreux.
- reproductibles.
- les tests *in vitro* permettent d'évaluer séparément les effets biologiques de chacun des composants du matériau.

● *inconvenients*

- ils n'ont que peu de rapport avec la clinique.
- ils sont trop sensibles

2- Les tests *in vivo*

● *avantages*

- ils sont beaucoup plus proches de la clinique

- ils permettent d'évaluer les effets d'un

matériau sur des organes loin de l'organe cible.

- ils permettent d'évaluer la toxicité des

métabolites. Un matériau peut en effet se révéler

biocompatible alors que ses produits de

dégradation, une fois métabolisés par l'organisme

se révèlent être dangereux.

- l'interprétation des résultats est parfois plus

facile car le rapport avec la clinique est souvent

plus évident.

- ***inconvenients***

- les tests réalisés sur des animaux de laboratoire (deux espèces de mammifères) peuvent ne pas avoir de rapport avec l'espèce humaine.

- l'effet néfaste peut passer inaperçu s'il est non recherché donc non évalué

- timing incorrect de l'essai (l'effet délétère se manifeste après les périodes d'observation), l'évaluation et l'interprétation des résultats peut être difficile.

- il peut être difficile de simuler la pathologie préexistante (carie, lésion parodontale).

VI- Conclusion

L'évaluation de la biocompatibilité ne peut être faite qu'à partir d'un ensemble de tests.

Ces derniers doivent être réalisés mais surtout interprétés par des spécialistes en fonction de la future utilisation clinique du biomatériau.