

## 4 Etude *in vitro* de la diffusion calcique intra-dentinaire induite par deux biomatériaux endodontiques

### Résumé

Le but de cette étude *in vitro* a été d'évaluer la pénétration calcique au sein de la dentine induite par deux biomatériaux canalaires, l'un à base d'oxyde de calcium, l'autre à base d'hydroxyde de calcium.

L'obturation de dents de porc a été réalisée sans préparation canalair préalable. Les matériaux ont été insérés dans le canal pendant 8 jours, 15 jours et 21 jours.

Les échantillons ont ensuite fait l'objet d'une étude en micro-analyse à différents niveaux et, parallèlement, d'observations en microscopie électronique à balayage en B.E.I. (Backscattered Electron Image).

Les rapports Ca/P obtenus grâce à la micro-analyse se sont révélés plus élevés pour les échantillons obturés à l'aide de la préparation à base d'oxyde de calcium ; d'autre part, la distance sur laquelle ce rapport est augmenté croît avec le temps et est également supérieure pour ces mêmes échantillons comparativement à ceux obturés à l'aide d'hydroxyde de calcium.

Les clichés réalisés en B.E.I. ont permis de confirmer ces résultats mettant en évidence des franges de rétrodiffusion correspondantes.

Les matériaux à base d'hydroxyde de calcium sont très largement utilisés en tant que médication temporaire endodontique soit pour assainir l'endodonte lors d'infections canales et apicales (1), soit pour induire des processus d'apexogénèse ou d'apexification (2).

Leur utilisation s'appuie sur certaines propriétés de l'hydroxyde de calcium : son pH élevé, la diffusion d'ions  $\text{OH}^-$  à travers la dentine entraînant une variation graduelle de pH (3) ainsi que la diffusion des ions  $\text{Ca}^{++}$  à travers la dentine (4).

Lors d'une précédente étude (5), nous avons mis en évidence l'intérêt d'un biomatériau chargé en oxyde de calcium. En effet, ce dernier améliore l'herméticité de l'obturation en pénétrant les tubuli de façon systématique et en réduisant à minima l'interface dentine-matériau; ceci même sans préparation canalair. Ce matériau à base d'oxyde de calcium a la propriété de se transformer en carbonate de calcium en présence de gaz carbonique issu de la dégradation protéique et en hydroxyde de calcium au contact de l'eau résiduelle (5). (important)

Cette dernière transformation chimique permet de supposer que ce biomatériau bénéficie des propriétés spécifiques de l'hydroxyde de calcium.

Cette étude *in vitro* permet de comparer la pénétration calcique induite au sein de la dentine par l'hydroxyde de calcium d'une part et l'oxyde de calcium d'autre part.

## Matériel et méthode

L'étude a été réalisée sur des dents monoradiculées inférieures de porcs destinés à la consommation et fraîchement abattus. Les animaux étaient âgés de 6 mois, ce qui correspond à la période prépubertaire de l'animal. Ces conditions présentent l'avantage d'obtenir des lots homogènes : les animaux sont de même race, de même âge et sont sacrifiés le même jour. La dent de porc présente une ultrastructure identique à la dent humaine. Après extraction et section transversale de la couronne, chaque dent a été dépulpée puis conservée à 4° C dans une solution d'eau distillée complétée par des antibiotiques (pénicilline - streptomycine 100 U I et 100 µg/ml respectivement).

Deux matériaux ont été testés :

- une préparation à l'hydroxyde de calcium, obtenue par mélange de poudre d'hydroxyde de calcium pur à 99,9% et d'eau distillée stérile,
- une préparation à base d'oxyde de calcium composée de 66,7 % d'oxyde de calcium lourd et 33,3 % d'oxyde de zinc mélangée à de l'eau glycollée à 80%.

Les dents utilisées ont été réparties en trois groupes homogènes de 9 dents chacun, groupe A : témoin ; groupe B : recevant la préparation à l'oxyde de calcium ; groupe C : celle à base

d'hydroxyde de calcium. Ces dents n'ont pas fait l'objet de préparation canalaire autre que la dépulpation. (humidificateur.)

La mise en place canalaire de ces deux préparations différentes a été réalisée à l'aide d'une bourre-pâte sous une hotte à flux laminaire dans des conditions stériles.

Chaque échantillon a ensuite été fermé aux deux extrémités à l'aide d'un ciment provisoire à base d'oxyde de zinc et de sulfate de calcium sans eugénol.

Les échantillons ont été incubés séparément en chambre humide dans une enceinte anaérobie à 37° C (Forma scientifique : 1028 ; 80 % N<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>).

Dans chaque groupe, des séries de 3 dents ont été incubées pendant différentes périodes : 8 jours, 15 jours et 21 jours.

Après incubation, les échantillons ont été inclus dans une résine époxy. Les plots ont été ensuite polis de manière à exposer la partie canalaire contenant le matériau. Le polissage a été réalisé à l'aide de disques de papier abrasif de carbure de silicium d'indice de grains 220, 330, 500 puis 1200. Un dernier polissage a été effectué à l'aide de draps diamantés d'indice de grains 3 µ et 1 µ de façon à obtenir une planéité parfaite.

Les échantillons ont enfin été nettoyés à l'alcool, puis leur surface métallisée par électro-déposition d'or colloïdal d'une épaisseur de 20 nm.

La micro-analyse a été réalisée grâce à un système Tracor Northern T.N. 2000 associé à un microscope électronique à balayage (Jeol J.S.M. 35 F) travaillant pour l'analyse à 15 Kv. Cet appareil permet la détection de tous les éléments dont le numéro atomique est supérieur ou égal à 4 avec une précision relative à 1 % sur un volume de 1 µ<sup>3</sup>. Un programme d'analyse semi-quantitative (Standarless semi-quantitative analysis) par ordinateur permet de calculer à partir de valeurs tabulées la concentration des divers éléments identifiés.

Les valeurs de ces concentrations sont affinées par un calcul itératif (programme ZAF) tenant compte des interactions d'absorption et de fluorescence entre les différents éléments.

Les éléments choisis pour l'identification sont : le calcium, le phosphore, le magnésium et le zinc.

Pour chaque échantillon, la micro-analyse a été effectuée de façon centripète sur 6 points situés sur un axe "xy" et répartis de la manière suivante :

- point 1 : à 400 µ du bord radiculaire externe
- point 2 : à 600 µ du bord radiculaire externe
- point 3 : à 600 µ de la paroi canalaire
- point 4 : à 400 µ de la paroi canalaire
- point 5 : à 200 µ de la paroi canalaire
- point 6 : à 100 µ de la paroi canalaire

(fig. 1)

Ces résultats sont systématiquement couplés à une analyse autoquantitative réalisée sur 14 points situés sur le même axe que précédemment. Ces points espacés de  $10\ \mu$  se répartissent sur une distance de  $130\ \mu$  depuis la paroi canalaire (fig. 1).

Ces mesures ont été réalisées à différents niveaux pour chaque échantillon.

Parallèlement, les mêmes échantillons ont fait l'objet d'observations en microscopie électronique à balayage (Jeol JSM 6400) à un grossissement de  $\times 350$  sous une tension de 11 kv. Ces observations ont été réalisées en B.E.I. (Backscattered Electron Image) qui permet d'obtenir des informations qualitatives quant à la composition de l'échantillon puisque la rétrodiffusion est fonction du numéro atomique des éléments.

## Résultats

La moyenne des différents relevés effectués pour chaque groupe d'échantillons a permis d'établir des courbes illustrant la variation du rapport Ca/P en fonction de la distance, ceci pour chaque période d'incubation. Les concentrations en magnésium et en zinc ne présentent aucune variation.

A 8 jours d'incubation le rapport Ca/P augmente pour le groupe B et le groupe C par rapport au groupe A témoin (fig. 2) dont le rapport varie peu (1,3 à 1,4).

Cette évolution est progressive pour les échantillons du groupe B où le rapport augmente nettement (1,5) depuis  $40\ \mu$  à  $60\ \mu$  de la paroi canalaire pour prendre des valeurs plus élevées (2,85) au niveau de la zone pariétale (fig. 2).

Pour les échantillons du groupe C, l'augmentation du rapport Ca/P débute à  $30\ \mu$  de la paroi canalaire pour atteindre un maximum de 2,19 au niveau de la zone pariétale (fig. 2).

L'examen des clichés réalisés en B.E.I. a confirmé ces résultats mettant en évidence des franges de rétrodiffusion de  $54\ \mu$  pour les échantillons du groupe B (fig. 3) et de  $30\ \mu$  pour ceux du groupe C (fig. 4).

A 15 jours d'incubation, les valeurs du rapport Ca/P ont nettement augmenté pour le groupe B. En effet, ce rapport est de 1,64 à  $110\ \mu$  de la paroi canalaire et de 2,37 au niveau de la zone pariétale (fig. 5). Par contre, pour le groupe C, le rapport Ca/P est de 1,62 à  $70\ \mu$  de la paroi canalaire et de 2,30 au niveau de la zone pariétale (fig. 5).

Les observations en B.E.I. confirment ces résultats avec la présence d'une frange de rétrodiffusion de  $120\ \mu$  pour les échantillons du groupe B (fig. 6). Le cliché met également en évidence la pénétration intratubulaire du matériau à base d'oxyde de calcium au-delà de la zone de rétrodiffusion (fig. 6). Par contre, cette frange n'est repérable que sur une cinquantaine de microns lorsque les dents sont obturées avec la préparation à l'hydroxyde de calcium (fig. 7).

A 21 jours, les moyennes du rapport Ca/P enregistrées pour le groupe B sont encore plus élevées et sur une distance plus importante. En effet, ce rapport est de l'ordre de 1,79 à 130  $\mu$  de la paroi canalaire et de 2,72 au niveau de la zone pariétale (fig. 8), alors que dans le groupe C, l'augmentation du rapport Ca/P se manifeste d'une manière plus marquée qu'à 15 jours d'incubation mais sans progression de distance.

Ainsi ce rapport est de 1,79 à 40  $\mu$  de la paroi canalaire et de 2,56 au niveau de la zone pariétale (fig. 8). L'examen en B.E.I. des échantillons du groupe C montre bien une frange de rétrodiffusion de 60  $\mu$  au voisinage de la paroi canalaire (fig. 9) comparativement à une frange de 160  $\mu$  pour les échantillons du groupe B (fig. 10).

Sur l'ensemble des trois groupes et quelle que soit la période d'incubation, le rapport Ca/P reste constant au niveau de la dentine proximale du rebord radiculaire, cette zone servant de témoin. Pour le groupe des échantillons obturés avec la préparation à base d'oxyde de calcium, les observations en B.E.I. montrent une diminution significative de la rétrodiffusion du matériau d'obturation en fonction du temps.

## Discussion

Les préparations à base d'hydroxyde de calcium libèrent au niveau de la cavité endodontique des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et des ions  $\text{OH}^-$  de façon contrôlée et prolongée avec un effet thérapeutique (2).

L'étude de Deardorf et coll. (4) mesurant la concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu extraradiculaire met en évidence une perméabilité de la dentine aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  à 7 jours. De même, Tronstadt et coll. (3) ont montré chez le singe une variation du pH intradentinaire après obturation à l'hydroxyde de calcium ; ce pH, fortement alcalin dans les zones pariétales, avoisine la neutralité au niveau de la dentine périphérique. Les conclusions de Tronstadt sont confortées par l'étude de Fuss et coll. (7) qui n'observent pas d'augmentation de pH extra-radiculaire après obturation à l'hydroxyde de calcium. De même, Staehle et coll. (8) ont mis en évidence dans la dentine intraradiculaire des zones d'alcalinité variables en fonction du matériau d'obturation utilisé.

Notre étude corrobore l'ensemble de ces conclusions ; en effet, la micro-analyse met en évidence l'augmentation du rapport Ca/P de la dentine sur tous les échantillons traités avec une préparation à base, soit d'oxyde de calcium, soit d'hydroxyde de calcium.

Ces résultats sont confirmés par les observations de ces mêmes échantillons en B.E.I. où il est mis en évidence une bande pariétale de pénétration dentinaire par le calcium. Il est à noter que ces franges de pénétration présentent une régularité significative d'un phénomène circonférentiel intéressant tout le volume intradentinaire pariétal.

Cette diffusion est beaucoup plus profonde et beaucoup plus intense en valeur (Ca/P) lorsque les échantillons sont obturés avec des préparations à base d'oxyde de calcium.

Cette diffusion calcique s'effectue aussi au niveau de la matrice extracellulaire non minéralisée présente sur les parois canalaires d'échantillons qui n'ont subi ni préparation mécanique pariétale ni préparation chimique. Les images de rétrodiffusion indiquent une colonisation calcique de cette zone organique réduisant ainsi l'interface dent-matériau notamment avec la préparation à base d'oxyde de calcium. Pour ce même groupe la diminution de la rétrodiffusion au sein du matériau situé dans le volume canalaire est significative du transfert du calcium vers la dent.

Ces phénomènes suggèrent, comme pour la biominéralisation que l'impregnation massive d'ions  $Ca^{++}$  au contact du milieu intratubulaire est favorisée par les glycosaminoglycanes et les phosphoprotéines intratubulaires. En effet, les glycosaminoglycanes rétentives d'eau (9) intensifient la fixation du calcium (10) ; de même, les phosphoprotéines de caractère anionique synthétisées par l'odontoblaste ont une forte affinité pour le calcium (11,12).

La dynamique de pénétration du calcium exogène contenu dans les préparations canalaires est accentuée dans le cas de matériaux à base d'oxyde de calcium par le fait que ce sel n'est pas hydraté au départ contrairement à l'hydroxyde de calcium. De plus, Koutsoukos et Nancollas (13) ont montré la possibilité d'une précipitation *in vitro* de phosphate de calcium avec nucléation d'hydroxyapatite sur du collagène en présence de solutions saturées en phosphate de calcium lorsque le pH était supérieur à 7.

Dans une autre étude, Nancollas et coll. (14) précisent la formation de phosphate octocalcique comme phase précurseur de la croissance de l'hydroxyapatite ; ce phosphate octocalcique se présente sous la forme de rosettes cristallines caractéristiques identifiables en microscopie électronique à balayage.

Des formations cristallines similaires intratubulaires ont été fréquemment observées dans cette étude avec les préparations à base d'oxyde de calcium mais aussi de façon moins prononcée avec celles à base d'hydroxyde de calcium.

Ceci nous amène à émettre l'hypothèse qu'une précipitation octocalcique intratubulaire renforcerait les zones de rétrodiffusion positives relevées au niveau de nos résultats.

En conclusion, notre étude confirme une pénétration d'ions  $Ca^{++}$  à partir de préparations à base d'oxyde de calcium et d'hydroxyde de calcium ; cependant, les préparations à base d'oxyde de calcium qui semblent bénéficier des propriétés spécifiques connues de l'hydroxyde de calcium présentent des effets potentialisés dans la pénétration intratubulaire, la réduction de l'interface et les transferts calciques du matériau au profit de la dentine radiculaire.

Ces résultats sont d'un grand intérêt sur le plan clinique et ouvrent de nouvelles perspectives en endodontie.

Fig 1 : localisation des relevés de micro-analyse et de l'analyse auto-quantitative :

- A : ligne de micro-analyse
- A' : ligne de l'analyse auto-quantitative
- B : biomatériau
- C : paroi canalaire
- D : paroi dentinaire externe
- E : inclusion

Fig. 2 : variations du rapport Ca/P à 8 jours d'incubation

Fig. 3 : rétrodiffusion à 8 jours, échantillon du groupe B (B.E.I. x 350)

Fig. 4 : rétrodiffusion à 8 jours, échantillon du groupe C (B.E.I. x 350)

Fig 5 : variations du rapport Ca/P à 15 jours d'incubation

Fig. 6 : rétrodiffusion à 15 jours, échantillon du groupe B (B.E.I. x 350), mise en évidence de nombreuses expansions intratubulaires de matériau.

Fig. 7 : rétrodiffusion à 15 jours, échantillon du groupe C (B.E.I. x 350)

Fig. 8 : variations du rapport Ca/P à 21 jours d'incubation

Fig. 9 : rétrodiffusion à 21 jours, échantillon du groupe C (B.E.I. x 350)

Fig 10 : rétrodiffusion à 21 jours, échantillon du groupe B (B.E.I. x 350)

## Bibliographie

1. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated parachlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985 ; 1 : 170-175.
2. Tronstad L. *Clinical Endodontics*. New-York : Thieme G 1991 ; 98-117.
3. Tronstad L, Andreasen J O, Hasselgren G, Kristerson L, Riiss I. Ph changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endodon* 1981 ; 7 (1) : 17-22.
4. Deardorf K A, Swartz M L, Newton C W, Brown C E. Effect of root canal treatments on dentin permeability. *J Endodon* 1994 ; 20 (1) : 1-5.
5. Guigand M, Vulcain JM, Dautel-Morazin A, Bonnaure-Mallet M. An ultrastructural study of root canal walls in contact with endodontic biomaterials. *J Endodon* (in press).
6. Fohr P. Hydroxycalcithérapie endodontique. *AOS* 1986 ; 154 : 335-345.
7. Fuss Z, Szajkis S, Tagger M. Tubular permeability to calcium hydroxide and to bleaching agents. *J Endodon* 1989 ; 15 (8) : 362-364.
8. Staehle H J, Spiess V, Heinecke A, Müller H P. The effect of root canal filling materials containing calcium hydroxide on the alkalinity of root dentin. *Endod Dent Traumatol* 1995 ; 11 : 163-168.
9. Pellat B. Biochimie des différentes structures de l'organe dentaire. *Encycl Med Chir (Paris France). Stomatologie*, 22001 G<sup>o</sup>, 9, 1989.
10. Engelfeldt B, Hjerpe A. Glycosaminoglycans of dentin and predentin. *Calcif Tissue Res* 1972 ; 10 : 152-159.
11. Leaver A G, Triffitt J T, Holbrook I B. Newer knowledge of non collagenous protein in dentin and cortical bone matrix. *Clinical orthopaedics and related research* 1975 ; 110 : 269-292.
12. Jones I L, Leaver A G. Studies on the minor components of the organic matrix of human dentin. *Arch Oral Biol* 1974 ; 19 : 371-380.
13. Koutsoukos P G, Nancollas G H. The mineralization of collagen in vitro. *Colloids surfaces* 1987 ; 28 : 95-108.
14. Nancollas G H, Lore M, Perez L, Richardson C, Zawacki S J. Mineral phases of calcium phosphate. *Anat Rec* 1989 ; 224 : 234-241.



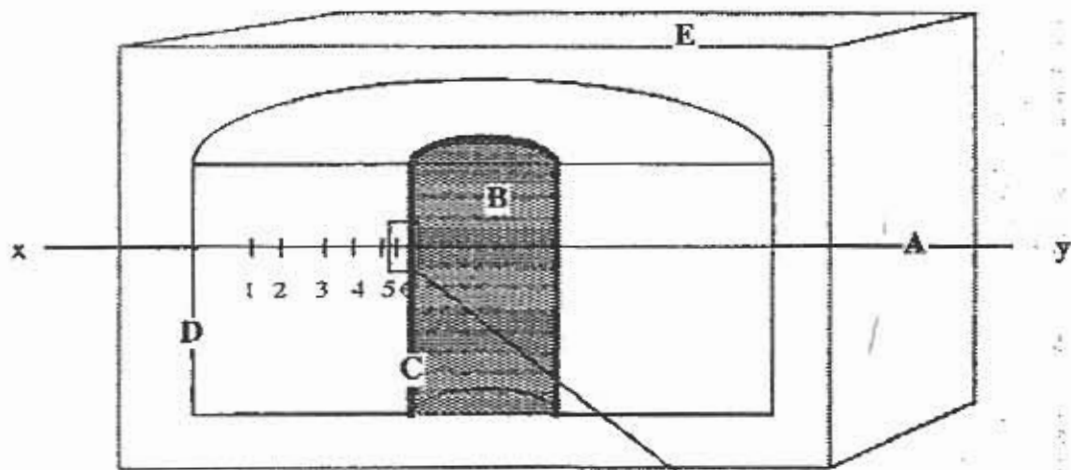


Fig. n° 1

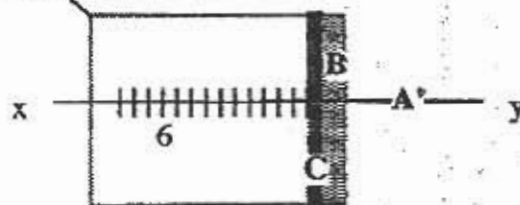


Fig.2: Ca/P ratio D8.

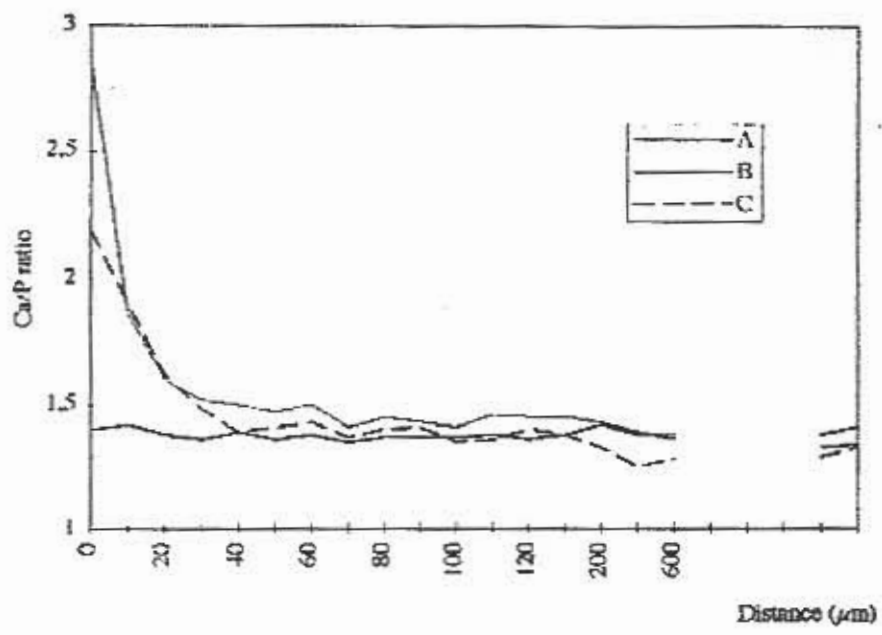


Fig. 5 : Ca/P ratio D15

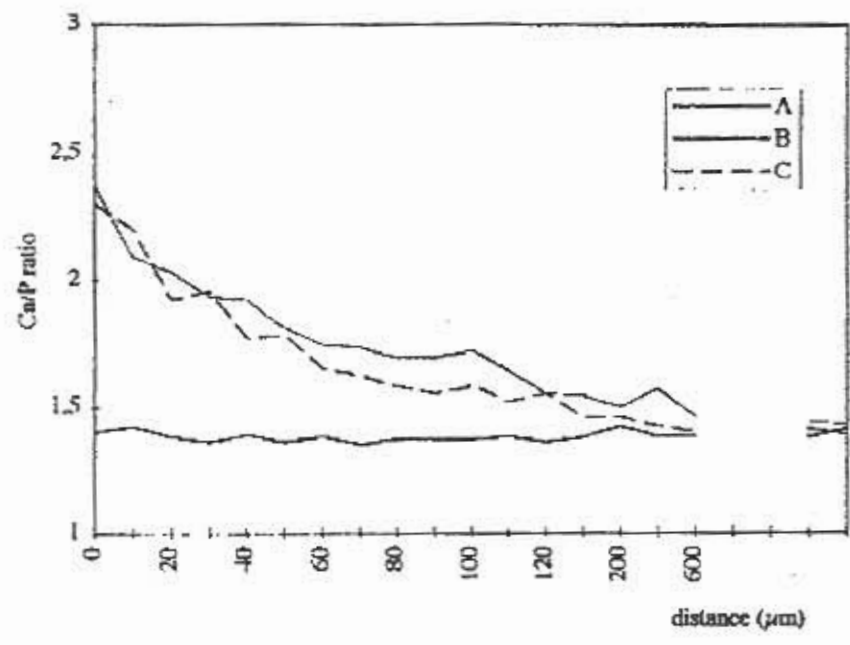


Fig. 8 : Ca/P ratio D21

