

Université de Montréal

**L'évaluation de la génotoxicité des biomatériaux métalliques
par l'essai « *in situ* end-labeling » en microscopie électronique**

par

Michel Assad

Département de médecine

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

Juillet 1999

© Michel Assad, 1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**L'évaluation de la génotoxicité des biomatériaux métalliques
par l'essai « *in situ* end-labeling » en microscopie électronique**

présentée par:

Michel Assad

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

L'Hocine Yahia, Ph.D.	président du jury
Charles-H. Rivard, M.D.	directeur de recherche
Nicole Lemieux, Ph.D.	codirectrice de recherche
Saroj K. Chakrabarti, Ph.D.	membre du jury
Jan Van Humbeeck, Ph.D.	examineur externe
Gilles Bleau, Ph.D.	représentant de l'examineur externe
Antonio Nanci, Ph.D.	représentant du doyen

Thèse acceptée le:

SOMMAIRE

Des études cliniques ont démontré que certains implants métalliques peuvent déclencher des réactions de carcinogénéité. En effet, il semble que le relargage ionique et la corrosion peuvent initier des néoplasmes. Le noyau semble être le compartiment cellulaire cible de ces ions métalliques. Le développement d'essais quantitatifs *in vitro* capables d'évaluer cette carcinogénéité potentielle est donc essentiel dans la présélection des biomatériaux métalliques. Cependant à l'échelle ultrastructurale, actuellement il n'existe pas véritablement d'essais capables de localiser et de quantifier à la fois les dommages occasionnés à la molécule d'ADN ainsi qu'à sa réparation.

Dans ce travail, il s'agissait d'abord d'adapter, en biocompatibilité, une méthode simple capable de détecter, quantifier et localiser précisément les cassures d'ADN qu'induisent les biomatériaux métalliques à la chromatine cellulaire. Pour ce faire, l'essai « *in situ* end-labeling » (ISEL) en microscopie électronique a été évalué après avoir utilisé un protocole d'extraction des biomatériaux en conditions semi-physiologiques et exposé des lymphocytes sanguins humains normaux. Cette technique immunocytochimique utilise l'exonucléase III pour sa capacité de digérer et d'amplifier les lésions d'ADN produites. Une polymérisation est ensuite exécutée en présence des quatre nucléotides de l'ADN: la thymidine est toutefois remplacée par une base analogue, soit la biotine-dUTP. Cette dernière est localisée par marquage immunologique à l'or colloïdal comme rapporteur moléculaire. Les particules d'or sont alors détectées en microscopie électronique à transmission; elles correspondent aux cassures simple-brin induites à la molécule d'ADN lors de la culture de cellules en

présence de l'extrait à étudier. La quantification a été effectuée avec l'aide du Programme *Image* du *NIH*.

L'ISEL s'est avéré très utile pour sa rapidité, sa capacité de marquer à la fois la chromatine interphasique et métaphasique, et la possibilité de quantifier les dommages causés à l'ADN. Par ailleurs, il ne nécessite pas l'utilisation de la radioactivité. De plus, il semble capable de détecter des phénomènes de mort cellulaire telle que l'apoptose. L'« *in situ* end-labeling » en microscopie électronique s'avère aussi un instrument intéressant pour la présélection des biomatériaux. En effet, la génocompatibilité du titane (Ti) pur, bien connu pour sa biocompatibilité, a été évaluée afin de valider cet essai.

Ensuite, la génotoxicité relative du nickel-titane (NiTi) a été évaluée et comparée à celle du titane pur, du nickel (Ni) pur et de l'acier inoxydable. Le NiTi représente un biomatériau potentiel, cependant sa biocompatibilité est controversée vu son important contenu en nickel soit de 50%. L'évaluation de la carcinogénicité du NiTi représente donc un intérêt important. Un essai d'absorption atomique a aussi été réalisé afin d'évaluer le relargage de nickel et de titane, et afin de mieux comprendre le rôle de ces ions dans la carcinogénicité métallique.

L'ISEL a semblé ici tout aussi utile dans l'évaluation de la biocompatibilité du nickel-titane. En effet, grâce à cet essai, des résultats fort encourageants ont été obtenus avec le NiTi. Ce dernier a donné des résultats comparables à ceux du titane pur. Par contre, l'acier inoxydable 316-L peut dans certains cas produire aussi des dommages à la chromatine. Par conséquent, cet essai *in vitro* de génotoxicité nous permet d'être

optimiste quand à l'utilisation éventuelle de NiTi à titre d'implant chirurgical permanent.

MOTS-CLÉS

biocompatibilité; biomatériaux; génotoxicité; chromosomes; noyaux; ADN; "*in situ* end-labeling"; or colloïdal; microscopie électronique; nickel-titane;

TABLE DES MATIÈRES

page

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	XIV
AVANT-PROPOS	XX
INTRODUCTION.....	1
CYTOTOXICITÉ	1
<i>Viabilité cellulaire : intégrité membranaire</i>	<i>2</i>
<i>Métabolisme cellulaire : fonction mitochondriale.....</i>	<i>4</i>
<i>Prolifération cellulaire: synthèse d'ADN.....</i>	<i>6</i>
CARCINOGENICITÉ.....	8
<i>Initiation</i>	<i>8</i>
<i>Répercussions</i>	<i>11</i>
GÉNOTOXICITÉ ET QUANTIFICATION	13
<i>Objectifs généraux.....</i>	<i>13</i>
<i>Technique « in situ end-labeling ».....</i>	<i>14</i>
<i>Présentation des chapitres.....</i>	<i>15</i>

CHAPITRE 1: ADAPTATION DE L'ESSAI EM-ISEL EN BIOCOMPATIBILITÉ :	
MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE GÉNOTOXICITÉ	
(ARTICLE 1).....	18

“Immunogold Electron Microscopy In Situ End-Labeling (EM-ISEL): Assay for Biomaterial DNA Damage Detection” Assad M., Lemieux N., Rivard C.H., *Bio-Medical Materials and Engineering*, 7(6), pp.391-400, 1997.

ABSTRACT.....	19
KEY-WORDS	19
RUNNING HEADLINE	19
INTRODUCTION.....	20
MATERIALS AND METHODS.....	22
<i>Semi-physiological extraction of biomaterial</i>	22
<i>Cell cultures and slide preparation</i>	23
<i>Electron Microscopy In Situ End-Labeling (EM-ISEL)</i>	23
RESULTS.....	24
DISCUSSION.....	26
CONCLUSION	31
ACKNOWLEDGEMENTS	31
REFERENCES.....	31
FIGURE CAPTIONS	39

CHAPITRE 2: MISE EN PRATIQUE DE L'ESSAI EM-ISEL AVEC L'ALLIAGE	
NICKEL-TITANE (ARTICLE 2).....	47

“In Vitro Biocompatibility Assessment of a Nickel-Titanium Alloy using Electron Microscopy In Situ End-Labeling (EM-ISEL)” Assad M., Yahia L'H., Rivard C.H., Lemieux N., *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(1), pp.154-161, 1998.

ABSTRACT.....	48
KEY-WORDS	48
RUNNING HEADLINE	49
INTRODUCTION.....	49
MATERIALS AND METHODS.....	50
<i>Biomaterials Extraction</i>	50
<i>Cell culture</i>	51
<i>In situ end-labeling (ISEL)</i>	51
<i>Electron Microscopy</i>	53
<i>Immunogold counting</i>	53
<i>Statistical analysis</i>	53

RESULTS.....	54
DISCUSSION.....	55
CONCLUSIONS	59
ACKNOWLEDGEMENTS	59
REFERENCES.....	60
FIGURE CAPTIONS	69
CHAPITRE 3: LE NICKEL-TITANE ET SES CONSTITUANTS PURS :	
COMPARAISON PAR L'ESSAI EM-ISEL ET L'ABSORPTION ATOMIQUE	
(ARTICLE 3).....	80
<i>“Comparative In Vitro Biocompatibility of Nickel-Titanium, Pure Nickel, Pure Titanium, and Stainless Steel: Genotoxicity and Atomic Absorption Evaluation” Assad M., Lemieux N., Rivard C.H., Yahia L'H., Bio-Medical Materials and Engineering, 9(1), pp.1-12, 1999.</i>	
ABSTRACT.....	81
KEY-WORDS	81
RUNNING HEADLINE	81
INTRODUCTION.....	82
MATERIALS AND METHODS.....	83
<i>Biomaterial Extraction</i>	<i>83</i>
<i>Cell cultures.....</i>	<i>83</i>
<i>In Situ End-Labeling (ISEL).....</i>	<i>84</i>
<i>Electron Microscopy.....</i>	<i>85</i>
<i>Immunogold counting and image analysis.....</i>	<i>85</i>
<i>Statistical analysis</i>	<i>85</i>
<i>Metal ion analysis.....</i>	<i>86</i>
<i>Reliability of metal element measurements.....</i>	<i>86</i>
RESULTS.....	86
DISCUSSION.....	88
CONCLUSION	95
ACKNOWLEDGEMENTS	95
REFERENCES.....	96
FIGURE CAPTIONS.....	108
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	119
CARCINOGENICITÉ MÉTALLIQUE	119
<i>Génotoxicité : mécanismes généraux.....</i>	<i>120</i>
<i>Les biomatériaux métalliques et leurs composantes.....</i>	<i>122</i>
<i>Conséquences de l'exposition ionique.....</i>	<i>131</i>

ESSAIS QUANTITATIFS DE GÉNOTOXICITÉ <i>IN VITRO</i>	132
<i>Justification</i>	132
<i>Techniques « in situ end-labeling »</i>	133
<i>L'avantage: détection de l'apoptose</i>	135
FACTEURS D'INFLUENCES.....	138
<i>Facteurs physico-chimiques</i>	138
<i>Facteurs endogènes</i>	141
<i>Facteurs environnementaux</i>	147
CONCLUSION GÉNÉRALE ET DÉVELOPPEMENTS FUTURS	147
BIBLIOGRAPHIE	151
ANNEXE I.....	XXII
ANNEXE II.....	XXIX
REMERCIEMENTS.....	XXXII
<i>CURRICULUM VITAE</i>	XXXIV

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1. <i>In vitro</i> DNA damage as measured using the EM-ISEL assay	38
--	----

Chapitre 2

Tableau 1. Immunogold particles/ μm^2 interphase nuclei chromatin.....	67
--	----

Tableau 2. Immunogold particles/ μm^2 metaphase chromosomal chromatin	68
---	----

Chapitre 3

Tableau 1. Immunogold particles/ μm^2 interphase nucleus chromatin	105
--	-----

Tableau 2. Immunogold particles/ μm^2 metaphase chromosomal chromatin	106
---	-----

Tableau 3. Average release of metal ions after 24h in semiphysiological medium.....	107
--	-----

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1a : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.....	40
Figure 1b : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.....	41
Figure 1c : Chromosome métaphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.....	42
Figure 2a : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.....	43
Figure 2b : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.....	44
Figure 2c : Noyau interphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.....	45
Figure 3 : Noyau apoptotique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.....	46

Chapitre 2

Figure 1a : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.....	70
Figure 1b : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.....	71

Figure 1c : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.....	72
Figure 1d : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.....	73
Figure 1e : Noyau interphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.....	74
Figure 2a : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.....	75
Figure 2b : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.....	76
Figure 2c : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.....	77
Figure 2d : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.....	78
Figure 2e : Chromosome métaphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.....	79

Chapitre 3

Figure 1a : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.....	109
Figure 1b : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.....	110
Figure 1c : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.....	111

Figure 1d : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du nickel pur et marqué à l'EM-ISEL.....	112
Figure 1e : Noyau interphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.	113
Figure 2a : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.....	114
Figure 2b : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.....	115
Figure 2c : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.....	116
Figure 2d : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du nickel pur et marqué à l'EM-ISEL.....	117
Figure 2e : Chromosome métaphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.....	118

Annexe I

Figure 1 : L'essai " <i>in situ</i> end-labeling" en microscopie électronique (schéma).....	xxvi
--	------

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

AAS :	<u>Atomic Absorption Spectrophotometer,</u> <u>Atomic Absorption Spectrophotometry</u>
ADN :	<u>Acide désoxyribonucléique</u>
Al :	<u>aluminium</u>
Al³⁺ ou Al(III) :	<u>ion aluminium de valence III</u>
AMF :	<u>Alliage à mémoire de forme</u>
ANOVA :	<u>Analysis of variance</u>
ARN :	<u>Acide ribonucléique</u>
ASTM :	<u>American Society for Testing and Materials</u>
Bio-dUTP :	<u>Biotinylated-dUTP, voir dUTP</u>
BrdU :	<u>5-Bromo-2'-désoxyuridine</u>
°C :	<u>Degré celsius</u>
Ca :	<u>calcium</u>
Co :	<u>cobalt</u>
Co²⁺ ou Co(II) :	<u>ion cobalt de valence II</u>
CoCr :	<u>cobalt-chrome</u>
CoCrMo :	<u>cobalt-chrome-molybdène, commercialement : Vitallium</u>
cpTi :	<u>Commercially Pure Titanium</u>
Cr :	<u>chrome</u>
Cr³⁺ ou Cr(III) :	<u>ion chrome de valence III</u>
Cr⁵⁺ ou Cr(V) :	<u>ion chrome de valence V</u>
Cr⁶⁺ ou Cr(VI) :	<u>ion chrome de valence VI</u>

Cr₂O₃ :	<u>Trioxyde de chrome</u>
Cu :	<u>cuivre</u>
Cu²⁺ ou Cu(II) :	<u>ion cuivre de valence II</u>
dATP :	<u>Désoxyadénosine triphosphate</u>
DENA :	<u>Diéthylnitrosamine</u>
DNA :	<u>Deoxyribonucleic acid</u> , voir ADN
DNase :	<u>Deoxyribonuclease</u>
dTTP :	<u>Désoxythymidine triphosphate</u>
dUTP :	<u>Désoxyuridine triphosphate</u>
<i>E. coli</i> :	<u><i>Escherichia coli</i></u>
ECS:	<u>Échanges entre chromatides-sœurs</u>
EDTA :	<u>Ethylenediaminetetraacetic acid</u>
EM :	<u>Electron Microscopy</u> , <u>Electron Microscope</u>
EM-ISEL :	<u>Electron Microscopy-In Situ End-Labeling</u>
EOR :	<u>Espèces oxygénées réactives</u>
ER :	<u>Enzyme de restriction</u>
Exo III :	<u>Exonucléase III</u>
FDA :	<u>Food and Drug Administration</u>
Fe :	<u>fer</u>
Fe²⁺ ou Fe(II) :	<u>ion fer de valence II</u>
Fe³⁺ ou Fe(III) :	<u>ion fer de valence III</u>
Fpg :	<u>Formamidopyrimidine-DNA glycosylase</u>
g :	<u>Gramme</u>
h :	<u>Heure</u>

HA :	<u>Hydroxyapatite</u>
HeLa :	<u>Lignée de cellules cancéreuses (Helen Lack)</u>
HGA :	<u>Heated Graphite Atomizer</u>
H ₂ O ₂ :	<u>Peroxyde d'hydrogène</u>
HSA :	<u>Human Serum Albumin</u>
[³ H]-T :	<u>Thymidine tritiée</u>
IdU :	<u>5-Iodo-2'-désoxyuridine</u>
IgG :	<u>Immunoglobuline G</u>
IGPs :	<u>Immunogold particles,</u> Particules d'or colloïdal immunologiques
ISEL :	<u>In Situ End-Labeling</u>
ISH :	<u>In Situ Hybridization</u>
ISO :	<u>International Organization for Standardization,</u> Organisation Internationale de Normalisation
KCl :	<u>Chlorure de potassium</u>
kV :	<u>Kilovolt</u>
l ou L :	<u>Litre</u>
M :	<u>Molaire, nombre de moles par litre</u>
Mg :	<u>magnésium</u>
Mg ²⁺ ou Mg(II) :	<u>ion magnésium de valence II</u>
min :	<u>Minute</u>
ml ou mL :	<u>Millilitre</u>
mM :	<u>Millimolaire, voir M</u>
MMS :	<u>Méthyle méthanesulfonate</u>

Mn :	<u>manganèse</u>
Mⁿ⁺ ; M⁽ⁿ⁺¹⁾⁺ :	<u>métal ionique de valence <i>n</i> ou (<i>n</i>+1)</u>
Mo :	<u>molybdène</u>
MTT :	<u>Brome 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle de tétrazolium</u>
µg :	<u>Microgramme</u>
µl ou µL :	<u>Microlitre</u>
µm :	<u>Micromètre</u>
µm² :	<u>Micromètre carré</u>
µM :	<u>Micromolaire, voir M</u>
N :	<u>Nombre</u>
NADH :	<u><i>Nicotinamide Adenine Dehydrogenase</i></u>
NaOH :	<u>Hydroxyle de sodium</u>
Ni :	<u>nickel</u>
Ni²⁺ ou Ni(II) :	<u>ion nickel de valence II</u>
NiCl₂ :	<u>Chlorure de nickel</u>
NIH :	<u><i>National Institutes of Health</i> (É.-U.)</u>
NiS :	<u>Sulfure de nickel</u>
Ni₃S₂ :	<u>Sulfure de nickel (2)</u>
NiSO₄ :	<u>Sulfate de nickel</u>
NiTi :	<u>Nickel-Titane</u>
Nitinol :	<u><i>Nickel-Titanium Naval Ordnance Laboratory</i></u>
nm :	<u>Nanomètre</u>
NTA :	<u>Nitrilotriacétate</u>

O₂ :	<u>Oxygène (composé)</u>
O₂⁻ :	<u>Anion superoxyde</u>
¹O₂ :	<u>Oxygène singlet</u>
·OH :	<u>Radical hydroxyle</u>
8-OHG :	<u>8-Hydroxyguanine</u>
p53 :	<u>Tumor Suppressor Gene p53</u>
PBS :	<u>Phosphate-Buffered Saline</u>
Rédox :	<u>Réaction d'oxydoréduction</u>
rpm :	<u>Révolutions par minute</u>
RPMI :	<u>Roswell Park Memorial Institute</u> (milieu de culture développé au,)
S :	<u>Phase de Synthèse d'ADN</u>
SCE :	<u>Sister Chromatid Exchange</u> , voir ECS
SD :	<u>Standard Deviation</u>
SE :	<u>Standard Error</u>
SHNP :	<u>Composés sulfhydryles non protéiniques</u>
SMA :	<u>Shape Memory Alloy</u> , voir AMF
SOD :	<u>Superoxyde dismutase</u>
SSB :	<u>Single-Stranded Break</u>
2x SSC :	<u>2x Standard Saline Citrate solution</u>
SS 316L ; 316L SS :	<u>Acier inoxydable 316L</u>
TdT :	<u>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</u>
TFIIIA :	<u>Facteur de transcription TFIIIA</u> (protéine de régulation)
Ti :	<u>titane</u>
TiAlV ; Ti6Al4V :	<u>Alliage de titane Ti6Al4V</u>

TiO :	<u>Oxyde de titane</u>
TiO₂ :	<u>Dioxyde de titane</u>
TUNEL :	<i>TdT-mediated bio-dUTP nick end-labeling</i> , voir TdT
UDS :	<u>Unscheduled DNA Synthesis</u> , Synthèse d'ADN non programmée
UV :	<u>Ultraviolet</u>
V :	<u>vanadium</u> <u>Volt</u>
V³⁺ ou V(III) :	<u>ion vanadium de valence III</u>
vs. :	<u>Versus</u>
v/v :	<u>rapport volume/volume</u>
wt% :	<u>Weight percentage</u>

AVANT-PROPOS

La norme internationale ISO 10 993 en biocompatibilité suggère une certaine prise de conscience dans l'utilisation de l'animal de laboratoire. Lors de ma maîtrise, mes directeurs de recherches à ce moment, les Drs Yahia et Rivard, m'avaient suggéré ce petit « virage » : on souhaitait alors faire l'utilisation d'essais *in vitro* normalisés. J'ai pu en constater les avantages : la rapidité, le coût moindre et surtout le pouvoir de présélection diminuant les tests animaliers. Ce sont toutefois les inconvénients comme la subjectivité et la qualitatativité qui m'ont fait comprendre l'importante lacune qui existait alors en matière des tests *in vitro*.

Grâce au Dre Lemieux du Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire, j'ai trouvé des solutions qui s'offraient à nous, du moins en génocompatibilité. J'ai choisi de relever le défi car cela joignait l'utile à l'agréable puisque les chromosomes ont toujours suscité mon intérêt! Ce qui explique pourquoi je me suis retrouvé à cheval entre trois mondes scientifiques: les biomatériaux, la génétique et l'orthopédie. Cela n'a pas toujours été facile; cependant il a été enrichissant de rallier ces trois disciplines pendant les années de mon doctorat.

Les organismes tels que la *Food and Drug Administration* et l'*American Society for Testing and Materials* sont reconnus pour leur conservatisme, et il serait presque utopique de penser les voir s'ouvrir rapidement à de nouveaux types d'essais de biocompatibilité, il faut en convenir. Quoiqu'il en soit, on pourra certainement surveiller l'intérêt suscité par ce travail dans un prochain avenir.

Cette thèse présentée par articles est divisée en sept grandes parties. D'abord, on retrouve une revue générale de la littérature en biocompatibilité *in vitro* en guise d'introduction. On a ensuite trois articles qui ont été publiés ou prochainement publiés dans des revues scientifiques de calibre international (le premier et le deuxième ont été publiés en 1997 et 1998 respectivement; le troisième est, au moment d'écrire ces lignes, sous presse). Chaque article correspond à un chapitre. Une discussion générale s'ensuit. Puis, on retrouve une bibliographie qui correspond aux sources de références que j'ai utilisées dans ce travail, y compris celles des trois articles principaux. Enfin, deux comptes rendus de conférences publiés dans des revues avec comité de lecture ont été ajoutés en annexes.

INTRODUCTION

CYTOTOXICITÉ

L'évaluation de la biocompatibilité *in vitro* de biomatériaux potentiels nécessite l'analyse de la performance du matériau en question en utilisant une grande variété d'essais : ceux de cytotoxicité, de carcinogénicité et de génotoxicité pour n'en nommer que quelques uns. Les normes à suivre dans ce domaine sont depuis 1992 celles de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO, 1992b; ISO, 1992c). Les avantages de ces tests *in vitro* sont généralement leur économie, leur rapidité, ainsi que leur contribution à réduire l'expérimentation animale. À la lumière de ces essais semi-physiologiques en culture cellulaire, une présélection des matériaux peut être effectuée en fonction de leur performance.

Comme certains biomatériaux peuvent être cytostatiques i.e. endommager seulement une fonction ou un compartiment cellulaire, certains auteurs suggèrent une approche plus spécifique et le développement de tests innovateurs visant des fonctions cellulaires ciblées. D'autres souhaitent le développement de systèmes ou de batteries d'essais "compartimentalisés" où chacune des fonctions de la cellule est analysée séparément: l'intégrité membranaire, l'efficacité lysosomique, la synthèse de protéines, l'efficacité mitochondriale, la réplication de l'ADN, etc. (Watson, 1992). Voici d'abord un rappel de quelques uns des essais de cytotoxicité qui puissent répondre à cette approche. Les essais de contact direct, diffusion en agar, MTT et synthèse d'ADN non programmée apportent en effet tous des informations sur la compatibilité à l'échelle cellulaire.

Viabilité cellulaire : intégrité membranaire

Le contact direct

Les tests de contact direct et de diffusion en agar permettent l'apport d'informations sur la cytotoxicité des biomatériaux en visant entre autres l'intégrité de la membrane cellulaire. Le premier représente une technique de contact direct normalisée depuis un bon nombre d'années par l'*American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1991) pour l'étude de la cytotoxicité des matériaux. Il s'agit de déposer des échantillons du matériau dans des puits ou récipients de type Petri ayant été préalablementensemencés de lignées cellulaires de fibroblastes pendant une période minimale de 24 heures à 37°C. Un colorant vital, le violet cristal, est ensuite ajouté. Dans les cellules dont la membrane a été endommagée, le colorant n'est pas retenu dans le cytoplasme car la membrane cytoplasmique ne représente plus une barrière qui puisse retenir le colorant à l'intérieur. Les cellules viables demeurent ainsi colorées par opposition aux cellules où la coloration est absente.

Cependant, il existe quelques désavantages. En effet, dans ces conditions de contact direct, les propriétés physiques du matériau peuvent en effet affecter la réponse cellulaire et par conséquent compliquer l'évaluation des résultats pour ces tests. Les échantillons légers, par exemple, peuvent se déplacer dans le milieu ou bien sur la couche de cellules de façon à ne pas permettre un contact intime pendant cette évaluation. Des artefacts peuvent aussi être rencontrés dans le cas d'échantillons plus lourds : il peut s'agir d'un endommagement mécanique de la monocouche cellulaire par le contact du biomatériau. En effet, la densité d'un métal par opposition à celle d'un autre type de biomatériau plus léger peut être elle-même responsable de l'endommagement s'il

est placé directement sur la monocouche de cellules. Une réponse cellulaire non souhaitable, occasionnée par le manque de gaz et de nutriments, peut constituer un autre type d'artefact. Une attention particulière doit, dans ces conditions, être accordée afin de préserver la monocouche. Ceci réduit d'autant l'efficacité de l'essai. D'autres critiques à l'égard de cette méthode sont reliées à sa semi-quantitativité. En effet, l'observation de la zone de lyse et celle des changements morphologiques des cellules peuvent avoir une certaine teinte de subjectivité résultant de cette évaluation qualitative de la part de l'expérimentateur.

L'essai de diffusion en agar

Cette technique a été développée originalement par Guess et al. (1965). Ces derniers tentaient d'adapter la culture de cellules en contact direct en utilisant un mélange d'agar en phase solide de façon à offrir un support additionnel servant d'intermédiaire déposé sur les monocouches de cellules : une sorte d'alternative à la méthode de contact direct. L'essai de diffusion en agar représentait une technique de contact, cette fois, indirect. Elle a été normalisée aussi par l'ASTM (ASTM, 1991b) pour l'étude de la cytotoxicité des matériaux. Il s'agit de déposer des échantillons de matériau sur cette couche d'agar solidifiée et ce, dans des récipients de type Petri ayant aussi été préalablementensemencés de lignées cellulaires de mammifères pendant une période minimale de 24 heures à 37°C. Un colorant vital, le rouge neutre, est ensuite ajouté au mélange d'agar. Ce colorant soluble et très faiblement basique s'accumule dans les lysosomes des cellules viables. L'incorporation du rouge neutre se fait par pinocytose ou simplement par transport passif à travers la membrane. Dans les cellules dont la membrane a été endommagée, le colorant n'est pas retenu à l'intérieur de la matrice

lysosomique. La zone de coloration représente donc les cellules viables par opposition à la zone où la coloration est absente (cellules endommagées). On peut aussi combiner cet essai à une lecture spectrophotométrique comparative de la densité optique à l'intérieur des différents puits. On peut ainsi comparer la quantité de rouge neutre incorporée dans diverses conditions et établir le degré de cytocompatibilité relatif de potentiels biomatériaux.

Certains auteurs comme Wennberg et al. (1979) ont cependant observé un désavantage à utiliser l'essai de diffusion en agar. En effet, il y a une possibilité que la couche d'agar absorbe certaines composantes et interfère ainsi avec la diffusion de substances toxiques relarguées par les matériaux testés. Avec l'agar, on obtient tout de même un effet coussin qui distribue uniformément le poids du biomatériau tout en permettant une diffusion des produits de dégradation vers la couche de cellules confluentes (Assad et al., 1995).

Métabolisme cellulaire : fonction mitochondriale

L'essai MTT

L'essai MTT représente un autre test de cytotoxicité qui étudie cette fois l'activité mitochondriale de la cellule. Le brome 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle de tétrazolium (MTT) est en fait un substrat jaune pâle dont l'anneau de tétrazolium est clivé par des enzymes non spécifiques des mitochondries actives. On obtient ainsi un précipité bleu : le formazan. Cet essai a été introduit originalement par Mossman en 1983: la réduction des sels de tétrazolium en formazan était alors utilisée pour démontrer, histochimiquement, l'activité d'enzymes mitochondriales oxydatives et

non oxydatives (Mossman, 1983). Il s'agissait alors d'un essai colorimétrique afin d'évaluer les effets de certaines lymphokines et certains mitogènes sur la fonction mitochondriale. Plus récemment, il a servi pour l'évaluation rapide des dommages occasionnés à la fonction mitochondriale par des agents anti-tumeurs potentiellement cytotoxiques.

L'un des avantages de cette méthode est son évaluation quantitative, véritablement semi-automatique et par conséquent, sa rapidité. En effet, il est possible de doser l'absorbance des cristaux de formazan (à 550 nm) en utilisant un spectrophotomètre qui peut être combiné à un lecteur de plaques de puits entières; ce qui permet de générer des quantités de données pour l'analyse statistique. La radioactivité n'est pas utilisée comme c'est le cas dans des essais quantitatifs telle que l'incorporation de la thymidine tritiée, bien qu'une corrélation adéquate est quand même obtenue entre les deux types d'essais (Sgouras et Duncan, 1990). On peut toutefois retenir certains désavantages de l'utilisation de cet essai : les biomatériaux ne peuvent être testés que sous forme d'extraits. De plus, certaines lignées cellulaires ne produisent pas des niveaux assez élevés de formazan; il faut donc faire un choix adéquat de cellules. Sgouras et Duncan (1990) rapportent que les cellules, qui ont atteint la confluence, métabolisent le MTT plus lentement; il faut donc s'assurer que les cellules demeurent en phase logarithmique. Aussi, la stabilité du formazan est faible et les analyses doivent être effectuées dans des délais rapides. Certains (Denizot et Lang, 1986) ont également noté des possibilités d'interférence du phénol rouge et du sérum (tous deux inclus dans le milieu cellulaire) lors de la lecture au spectrophotomètre; d'autres non (Ciapetti et al., 1993).

Prolifération cellulaire: synthèse d'ADN

Le test d'incorporation de thymidine tritiée

Le noyau est un autre compartiment important de la cellule. On le considère comme étant la cible principale pour la létalité cellulaire (Tubiana et al., 1986). Pour observer les effets sur l'ADN, on peut donc avoir recours à des composés qui seront incorporés au moment de la réplication de cette molécule. On utilise par exemple des indicateurs de la réparation de l'ADN non programmée (UDS : de l'anglais *unscheduled DNA synthesis*). En effet, la réparation de l'ADN est effectuée par un mécanisme d'excision (via une endonucléase) qui reconnaît le dommage et incise le nucléotide altéré. Une polymérase ADN s'active ensuite et effectue sa fonction de synthèse en utilisant les quatre nucléotides précurseurs. Le terme synthèse d'ADN non programmée dérive du fait que le cycle de croissance des cellules de mammifères possède une période programmée de synthèse d'ADN (phase S du cycle cellulaire). Toute synthèse ou incorporation extraordinaire de nucléotides exogènes dans l'ADN en dehors de cette phase est donc non programmée. Lorsqu'on la détecte en utilisant un marqueur de nucléotides, l'*UDS* devient alors un indicateur de réparation des dommages à l'ADN dans ces cellules (Rasmussen, 1980).

On utilise surtout les précurseurs ou analogues de la thymidine, constituant spécifique de l'ADN. Traditionnellement, la prolifération cellulaire était quantifiée à l'aide du test d'incorporation de la thymidine tritiée ($[^3\text{H}]\text{-T}$). En effet, lors de la synthèse de l'ADN, la polymérase I catalyse l'ajout des quatre nucléotides essentiels y compris la thymidine et ce, aux chaînes de l'ADN préexistantes (Gardner et al., 1991).

La synthèse est alors déterminée en rapportant la quantité de thymidine radioactive par unité de poids d'ADN, puis divisée par une valeur contrôle. L'essai peut être combiné à une méthode de comptage par autoradiographie ou par scintillation (Assad et al., 1995). Le désavantage principal de cette méthode est l'utilisation de la radioactivité et par conséquent le besoin de mesures de protection additionnelles afin d'éviter la possibilité de contamination radioactive.

Le test d'incorporation du 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU)

Aujourd'hui, il existe des bases analogues à la thymidine ayant une conformation spatiale très similaire. En effet, le 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU), tout comme la 5-iodo-2'-désoxyuridine (IdU) sont capables de s'incorporer aussi bien que la thymidine dans l'ADN cellulaire, et ce, lors de sa synthèse. Le BrdU devient donc à ce moment un compétiteur efficace de la thymidine. Pour être capable de le détecter, toutefois, il faut utiliser une étape supplémentaire puisqu'il n'y a pas ici de marqueur radioactif. Il s'agit donc d'ajouter subséquemment un anticorps monoclonal anti-BrdU afin de le détecter via des techniques immunocytochimiques.

Le BrdU est à présent utilisé fréquemment à titre de précurseur à la place de la thymidine tritiée (deFazio et al., 1987). Il semble être un indicateur aussi sensible et spécifique de la prolifération cellulaire que la thymidine tritiée, autant dans les études *in vitro* qu'*in vivo* (deFazio et al., 1987; Eldridge et al., 1990). Le BrdU est également utilisé en cytogénétique pour effectuer des caryotypes. En effet, l'incorporation du BrdU entraîne un défaut dans la condensation et une altération dans la structure des chromosomes (par la présence du volumineux atome de brome) dans les régions qui ont

incorporé cet analogue. Pour obtenir des bandes, il faut ensuite exposer les chromosomes aux U.V. qui provoquent des dommages. L'ADN endommagé ne retient pas le colorant. Cela permet ainsi de détecter les différentes bandes chromosomiques.

CARCINOGENICITÉ

Le noyau cellulaire, où se déroule la réplication et la réparation de l'ADN, est un compartiment cible en carcinogénicité métallique. Cette dernière constitue donc un autre thème important en biocompatibilité des métaux. La carcinogénicité métallique est en fait un phénomène complexe en soi et comme les métaux font partie d'un groupe très diversifié, il est possible qu'il existe plusieurs mécanismes qui puissent l'expliquer. En fait, chaque élément métallique pourrait avoir son propre mécanisme d'action, il en sera discuté plus tard dans la section discussion. Cependant, en examinant attentivement la littérature et en particulier celle sur les métaux, il a été possible de déduire quelques processus clés de la carcinogénicité métallique. Le présent travail s'est limité ici à l'aspect génotoxicité, l'une des étapes initiales de cette carcinogénicité.

Initiation

Interactions directes

L'initiation de la carcinogénicité métallique peut résulter des nombreuses interactions directes des métaux avec l'ADN. Certains ions métalliques semblent en effet être des éléments intrinsèques de la molécule d'ADN. S'ils ne sont pas capturés par d'autres ligands avant de se rendre au noyau de la cellule, les cations métalliques peuvent se lier aux acides nucléiques qui sont de charges négatives (Cohen et al., 1991). Les anions phosphates (qui ont une affinité pour les métaux alcalins), ainsi que les

atomes d'oxygène et d'azote des quatre bases azotées représentent aussi des sites de liaisons possibles. Ils permettent à l'ADN de devenir un partenaire idéal pour les métaux. Avec les bases azotées spécifiquement, il peut s'agir aussi de différents types de liaisons selon Guille et al. (1981): une insertion entre deux bases pairées brisant leurs liaisons hydrogènes ou bien une intercalation entre deux bases adjacentes d'un même brin. Il peut ainsi survenir des cassures de liens covalents existant préalablement ou la formation de nouveaux liens covalents à l'intérieur de la molécule d'ADN. Ces modifications de la structure primaire occasionnent des mutations i.e. des modifications de pairages, des délétions, et ce, à la simple échelle des bases azotées (Guille et al., 1981) : par exemple cassures, dépurination, pontages, et modifications de séquences de bases et de désoxyriboses (Williams, 1981).

Interactions indirectes

Activation d'intermédiaires

Les ions métalliques peuvent agir aussi par l'action de leurs intermédiaires formés en présence d'oxygène (Kasprzak, 1995). L'oxydoréduction (rédox) des métaux produirait entre autres des radicaux hydroxyles, grâce à des réactions avec l'oxygène ou le peroxyde d'hydrogène (tous deux présents en milieu physiologique), ainsi qu'à un transfert d'électrons en parallèle. Les radicaux libres générés pourraient ensuite occasionner des dommages oxydatifs à la chromatine nucléaire. Plusieurs composés métalliques provoquent ainsi la formation de bases d'acides nucléiques hydroxylées et ce type de lésion semble être mutagénique (Floyd, 1990).

Inhibition de la réparation de l'ADN

Les métaux ont aussi accès à la matrice de l'ADN qui comprend des protéines nucléaires qui peuvent lier les métaux. En effet, pour plusieurs d'entre elles, la structure et la fonction dépendent essentiellement d'une bonne liaison avec certaines espèces ioniques. Les polymérase ADN utilisent, par exemple, le magnésium (Mg) et le manganèse (Mn) pour leur bon fonctionnement durant la synthèse. Une interférence avec cette liaison durant la réparation et la réplication de l'ADN peut avoir de lourdes conséquences. En effet, les ions métalliques qui interfèrent dans le processus de réparation de l'ADN, en se liant à la polymérase ADN de façon à affecter son travail de correction au moment de la synthèse, augmentent ainsi la fréquence d'erreurs et de mauvais pairages des bases azotées (Beyersmann et Hartwig, 1993).

Cette interférence de certains métaux au niveau de la réparation et la synthèse de l'ADN s'expliquerait par le phénomène de compétition inhibitrice. Le trouble occasionné durant la réparation de l'ADN proviendrait de la compétition que se livrent les différentes espèces ioniques telles que le Ni^{2+} ayant une conformation tridimensionnelle similaire au Mg^{2+} pour ces sites enzymatiques. Le Ni^{2+} n'est tout simplement pas un activateur efficace de la polymérase ADN et, de plus, sa présence aux sites d'activation prive la présence du magnésium. Hartwig et al. (1991) a pu expliquer ceci en démontrant que l'ajout de Mg^{2+} permettait de prévenir l'inhibition par le Ni^{2+} de la réparation des dommages occasionnés à l'ADN.

Comutagénicité

Un autre dommage indirect à l'appareil héréditaire est sans doute la comutagénicité ou effet synergique que provoque une combinaison d'agents irradiants

tels les rayons UV et la présence d'ions métalliques. En effet, les étapes enzymatiques nécessaires à enlever les photodimères que produisent les UV pourraient être là aussi affectées. Hartwig et al. (1990) ont employé la technique de l'analyse des cassures de brins de l'ADN par sédimentation de chromatine et ont démontré que plusieurs ions métalliques tels le nickel, le cobalt (Co), le plomb et le cadmium pouvaient inhiber la réparation des cassures occasionnées par l'irradiation UV des cellules HeLa humaines.

Répercussions

Activation d'oncogènes

Les séquences de ces interactions directes et indirectes deviennent importantes si les métaux parviennent à produire des mutations ponctuelles agissant particulièrement sur les proto-oncogènes. Ces derniers seraient des gènes inactifs du génome en temps normal, mais dont l'expression pathologique s'activerait au cours de la carcinogénèse. Par exemple, on sait que le chrome (Cr) induit des substitutions de bases azotées. Certains proto-oncogènes (l'oncogène *ras* pour n'en nommer qu'un exemple) pourraient tout simplement être activés lors de mutations ponctuelles (Kumar et al., 1990). Suite à une exposition à des métaux, l'initiation de tumeurs pourrait peut-être se faire par l'activation transcriptionnelle, la recombinaison ou l'amplification de proto-oncogènes suivant une exposition à des ions métalliques. On a notamment identifié des produits issus d'oncogènes comme étant des protéines pouvant stimuler la croissance de cellules malignes. Ce sont donc des protéines ayant des conformations tridimensionnelles similaires aux facteurs de croissance, ce qui expliquerait la capacité d'autostimulation que possèdent les tumeurs malignes.

Suppression d'anti-oncogènes

D'autres gènes, les anti-oncogènes que l'on appelle aussi "*tumor suppressor genes*" tel que le *p53*, ont des rôles suppresseurs de cette croissance illimitée des cellules cancéreuses. Des dommages membranaires, ainsi que des dommages à la molécule d'ADN occasionnés par les ions métalliques représentent des insultes que détecte le *p53*. Le rôle de ce dernier est par la suite d'arrêter le cycle cellulaire afin de permettre à la machinerie cellulaire d'effectuer les réparations nécessaires (Fleury et Degen, 1996). Si les dégâts sont trop importants toutefois, le *p53* provoquera l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les anti-oncogènes comme le *p53* ont donc un rôle important à jouer dans la prévention du cancer et on suppose que des mutations de ces derniers peuvent donc initier des transformations malignes (Weinberg, 1991).

Néoplasmes

Selon Fleury et Degen (1996), il s'agit donc d'un combat entre gènes pro-apoptose (pour le suicide cellulaire tel que programmé originalement dans la cellule) et anti-apoptose (pour la surprolifération cellulaire). Dans les cas où ces derniers remportent la lutte, il y a formation de néoplasmes et ainsi d'une prolifération cellulaire excessive et incontrôlée. Un néoplasme est qualifié de bénin s'il n'est pas invasif et demeure confiné à son site d'origine. S'il acquiert la capacité d'expansion dans les tissus normaux adjacents, il devient malin. Le néoplasme malin ne fait que croître et comprimer les tissus faisant obstacle à sa croissance. Il se distingue par le pouvoir d'envahir des tissus adjacents, de se disperser via les tissus sanguins, lymphoïdes et autres fluides corporels, gagnant ainsi l'accès à de nouveaux sites indépendants de celui de la masse tumorale initiale. Cette dispersion de cellules malignes peut ainsi donner

naissance à des métastases. Le potentiel métastatique est associé à des communications intercellulaires moins rigoureuses, des membranes cellulaires altérées et une capacité accrue de proliférer. Les métastases varient quant à leur volume; elles peuvent avoir la taille de nodules microscopiques et par la suite acquérir une masse relativement grande. Elles sont souvent multiples. Lorsqu'elles atteignent des organes ou des os plutôt distants, l'excision chirurgicale de dépôts métastatiques devient souvent difficile (Williams, 1981b). La potentielle induction de tumeurs malignes par l'implantation de biomatériaux métalliques est donc une question d'importance capitale, car le stade métastatique représente l'étape finale de la genèse des tumeurs malignes. La relation entre les métaux orthopédiques et l'initiation de tumeurs sera abordée dans la discussion générale.

GÉNOTOXICITÉ ET QUANTIFICATION

Objectifs généraux

Sunderman (1989) souhaite le développement de nouvelles études épidémiologiques qui puissent véritablement tester l'hypothèse du risque de cancer encouru par les patients avec des implants métalliques. Il suggère l'établissement d'un registre international qui puisse compiler les études épidémiologiques de tumeurs reliées à l'implantation. Enfin, Sunderman (1989) souhaite également le développement de nouveaux tests quantitatifs *in vitro* capables de présélectionner les biomatériaux quant à leur potentiel carcinogénique : une façon de prévoir les dangers de cancer dû au relargage ionique et particulaire des prothèses orthopédiques. Il faut selon lui approfondir les mécanismes moléculaires de la carcinogénicité métallique.

Le défi était donc d'adapter, en biocompatibilité, une méthode à la fois quantitative et capable d'élucider certains aspects de la carcinogénicité métallique. On a donc pu s'arrêter sur la génotoxicité ou l'initiation puisqu'elle représente l'une des étapes essentielles pour le déclenchement de la carcinogénicité. La validation d'un essai de génotoxicité quantitatif représente un projet très intéressant afin de répondre à la fois à la lacune principale des tests *in vitro* normalisés soit leur qualitatativité ou leur subjectivité souvent reprochée, ainsi qu'au besoin d'approfondissement des mécanismes moléculaires de la carcinogénicité métallique. Il s'agit donc de valider, en présence de métaux biocompatibles, une méthode simple capable de détecter, quantifier et localiser précisément les cassures d'ADN *in situ* sur la chromatine cellulaire. Il s'agit par la suite de vérifier le pouvoir de présélection de cet essai. Pour ce faire, nous avons utilisé le nickel-titane qui peut avoir des applications biomédicales potentielles en orthopédie, traumatologie et cardiologie.

Technique « *in situ* end-labeling »

Gosalvez et al. (1993b) ont mis au point une technique capable de détecter *in situ* des dommages occasionnés à l'ADN de souris et ce, en microscopie électronique. Ces derniers ont tenté de distinguer différents taux de sensibilité de la chromatine à la digestion d'enzymes de restriction (ER) spécifiques. Leur but a été principalement d'investiguer la structure et l'organisation chromosomique préparée spécifiquement pour l'observation en microscopie électronique. Pour ce faire, ils ont réussi à amplifier les cassures induites par les ER en utilisant l'exonucléase III de façon à produire de l'ADN simple-brin. Ce procédé permet une polymérisation en présence d'un nucléotide analogue à la thymidine, le dUTP biotinylé, ensuite détecté par streptavidine associée à de l'or colloïdal pour sa visualisation

en microscopie électronique à transmission. De plus, la fibre de chromatine semble mieux conservée que lorsque l'ADN est dénaturée par la chaleur, le NaOH ou la formamide (Gosalvez, 1993b). La méthode a été baptisée « *in situ* end-labeling » car elle permet de marquer certains terminaux adjacents aux cassures d'ADN occasionnées par les ER.

Fernandez et al. (1993) ont par la suite démontré la capacité de cette technique pour détecter les cassures d'ADN induites par les radicaux hydroxyles. Il semble en effet que 65-70% des lésions d'ADN induites par les radiations ionisantes sont médiées par ces radicaux (Roots et Okada, 1975). Fernandez et al. (1993) ont alors utilisé la même technique et ont réussi à localiser les cassures d'ADN occasionnées par ces radicaux le long des fibres de chromatine, à la fois chromosomique et nucléaire. Pendant ce temps, d'autres groupes de chercheurs démontrent l'avantage de cette technique pour la quantification de dommages induits à l'ADN lorsque ce dernier se dégrade au cours de l'apoptose (Migheli et al., 1995; Ansari et al., 1993; Coates et al., 1995).

Présentation des chapitres

Le premier chapitre montre comment la technique « *in situ* end-labeling » en microscopie électronique semble pouvoir répondre aux besoins de quantification identifiés en biocompatibilité et ce, grâce aux particules d'or immunologique que l'on peut comptabiliser. Pour ce faire, nous avons d'abord adapté la technique adéquatement en génotoxicité des biomatériaux. Préalablement, nous avons utilisé des protocoles normalisés d'extraction et de culture de cellules avant de mettre cette technique à l'épreuve. Un biomatériau métallique reconnu pour sa biocompatibilité, le titane pur, a donc été extrait en culture de cellules, en parallèle avec des contrôles négatifs et positifs.

Nous avons analysé des chromosomes provenant de lymphocytes humains normaux exposés à des extraits pour trois raisons principales : d'abord leur importance dans la réponse immunitaire (Shabalovskaya et al., 1997), leur cycle cellulaire bien connu et enfin la facilité de récolter leurs chromosomes (Lemieux et al., 1990). Les lésions génétiques sont induites en culture de cellules puis amplifiées *in situ* en présence d'exonucléase III. Le marquage de la chromatine métaphasique et interphasique est ensuite détecté à l'aide de l'hybridation aléatoire d'oligonucléotides lesquels sont utilisés comme codons d'initiation, extensionnés par le fragment de Klenow (de l'ADN polymérase I) à l'aide de dUTP non isotopique marqué (Fernandez et al., 1993). Les nouvelles séquences polymérisées incluant le dUTP biotinylé sont ensuite marquées par des anticorps anti-biotine couplés à des particules d'or colloïdal à titre de rapporteur moléculaire (Fetni et al., 1991).

Une fois la technique validée avec du titane pur comme contrôle clinique, l'essai « *in situ* end-labeling » est mis à l'épreuve en utilisant un biomatériau potentiel, le nickel-titane (Assad et al., 1998). Ce dernier est un alliage équiatomique qui possède déjà plusieurs applications biomédicales en orthopédie, traumatologie et cardiologie. Ce travail est présenté en détails au chapitre 2. Contrairement au titane (Ti) dont la biocompatibilité est connue, celle du nickel-titane demeure controversée principalement à cause de sa composition en nickel (50% Ni). La génotoxicité *in vitro* du NiTi est ici comparée à celle de l'acier inoxydable, puisque couramment utilisé aussi en orthopédie (Assad et al., 1999). Enfin, le chapitre 3 porte sur la biocompatibilité du nickel-titane comparée à celle de ses composantes pures (le nickel et le titane), et ce dans des conditions dynamiques d'agitation. Un parallèle est également effectué entre le relargage

ionique de nickel et de titane a aussi été effectué grâce à une technique d'absorption atomique.

CHAPITRE 1

ADAPTATION DE L'ESSAI EM-ISEL EN BIOCOMPATIBILITÉ : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE GÉNOTOXICITÉ (ARTICLE 1)

“Immunogold Electron Microscopy In Situ End-Labeling (EM-ISEL): Assay for Biomaterial DNA Damage Detection” Assad M., Lemieux N., Rivard C.H., *Bio-Medical Materials and Engineering*, 7(6), pp.391-400, 1997.

L'article fut soumis à l'éditeur-en-chef le 9 juin 1997 et il fut accepté le 9 octobre 1997.

ABSTRACT

We have evaluated a genotoxicity assay that combines *in situ* end-labeling, colloidal gold tagging and electron microscopy in order to adapt it to the measurement of *in vitro* biomaterial-induced genotoxicity. Human lymphocytes were cultured in semi-physiological medium which had been previously exposed to biomaterial extracts of commercially pure titanium following ISO standards. In order to visualize the location of induced DNA strand breaks, cells were then exposed to exonuclease III which partially digests and amplifies lesions by releasing nucleotides at free 3' hydroxyl ends from nicked double-stranded DNA. The resulting single-stranded DNA were allowed to hybridize with short oligonucleotides of random sequences including biotinylated dUTP. After random priming using *Escherichia coli* DNA polymerase I, incorporation of biotin-dUTP was detected by immunogold binding to the chromatin. Cells exposed to a mutagenic concentration of methyl methanesulfonate, as a positive control, showed a significantly higher and stronger gold staining than both titanium-exposed and unexposed specimens. This assay allows a precise localization and quantification of both *in vitro* DNA breakage and DNA repair. It could provide a powerful tool for rapid assessment of the genotoxic potential of new biomaterials.

KEY-WORDS

Biocompatibility, Genotoxicity, DNA damage, *In Situ* End-Labeling, Immunogold, Electron Microscopy

RUNNING HEADLINE

EM *In Situ* End-Labeling for Biomaterial DNA Damage Detection

INTRODUCTION

Approval of implantable medical devices requires a biocompatibility evaluation including *in vitro* testing which represents an important aspect of pre-screening for new biomaterials with biomedical potential [1]. In fact, *in vitro* assays are today encouraged by the scientific community including the International Organization for Standardization (ISO) which specifies that *in vitro* studies must necessarily precede animal tests [2]. This determination to reduce the number of experiments using laboratory animals and the demand for sensitive and quantitative reproducible protocols has therefore welcomed the development of new *in vitro* toxicity techniques, since highly toxic compounds will not be suitable for *in vivo* use. The need for *in vitro* quantitative methods of carcinogenicity testing to pre-screen metals with potential use in orthopedic prostheses has been particularly identified.

Indeed, the possibility of carcinogenicity induced by metallic biomaterials is of serious interest. Clinical and experimental studies have demonstrated case reports of local neoplasms in patients implanted with metal prostheses [3]. Takamura *et al.* have evaluated carcinogenicity associated with orthopedic implants in mice [4], and Sunderman has reviewed cases of malignant tumors at sites of implantation in both humans and domestic animals [5]. He speculated that metal particles produced by mechanical wear or metal ions resulting from corrosion factors might induce different malignant neoplasms [5]. In fact, the possible biological responses of a host to a biomaterial which is a candidate for clinical use include many cyto-compatibility reactions. At the cellular level, Ciapetti *et al.* [6] have hypothesized that metal ions affect specific cell subcompartments including organelles such as cytoplasmic

membranes, lysosomes, mitochondria, and also the nucleus. Furthermore, the latter compartment which includes the DNA molecules has been considered for a long time as the main target for cell lethality [7]. Metal alloys indeed represent a good example of materials modifying specific cell functions such as cell replication and DNA synthesis. Metal ions interference with the latter functions have been extensively studied over the past, and today metal genotoxicity is considered one of the initial steps towards metal carcinogenicity [8].

Assays evaluating the different degrees of genotoxicity were standardized over the years and, for example, ISO has approved the use of cytogenetic assays such as sister chromatid exchanges (SCEs) and unscheduled DNA synthesis (UDS) detection during DNA repair [9]. However, quantitative *in vitro* genetic toxicology tests directly localizing and quantifying both DNA damage and DNA repair at the electron microscopy (EM) level are still lacking. Therefore, the goal of this study was to evaluate the suitability of Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL) for the quantitative assessment of metallic biomaterials genotoxicity. Indeed, evaluation of induced DNA single-stranded breaks (SSBs) can be achieved by *in situ* hybridization (ISH) for EM observation using human lymphocytes whose chromosomes harvest has been extensively studied over the years. The method described here, named after the enzymatic digestion-repolymerization reactions it performs ("*In Situ* End-Labeling"), was originally developed by Gosalvez *et al.* [10,11] in order to specifically study the different patterns of chromosome bands and repetitive DNA sequences produced by restriction enzymes digestion of mouse chromosomes. The protocol specifically utilizes exonuclease III (Exo III) as the enzyme which simply acts by releasing nucleotides at 3'

ends of DNA breaks. This digestion is then followed by repolymerization in presence of biotin-labeled new nucleotides. When anti-biotin-directed antibodies are conjugated to colloidal gold particles, visualization of DNA damage and repair is greatly improved.

Commercially pure titanium (cpTi), a well-known orthopedic biomaterial with prosthetic applications, was used here as a material of reference for the evaluation and standardization of this assay. Its genotoxicity level was determined using EM-ISEL. The results obtained were compared with both those of a mutagenic concentration of methyl methanesulfonate (MMS), a clastogen, and those using untreated negative control media.

MATERIALS AND METHODS

Semi-physiological extraction of biomaterial

Following ISO 10993 sample preparation conditions [9], cpTi rods (Titanium Limited, Montreal, Canada) were reduced in standardized particles ($250 \mu\text{m} < \phi < 500 \mu\text{m}$) and extracted (0.2g biomaterial/ml media) at 37°C for 24 hours in RPMI-1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies, Grand Island, NY), 1% glutamine (Mediatech, Herndon, VA), 0.1% gentamicin (Schering, Montreal, Canada) and 1% phytohaemagglutinin (Murex Diagnostics, Dartford, England). The resulting media were then filtered at 0.2 μm . Untreated and MMS-treated (1mM; Aldrich, Milwaukee, WI) supplemented RPMI media were also established as negative and positive controls respectively.

Cell cultures and slide preparation

Human peripheral blood samples were obtained from a young healthy donor. Lymphocytes were prepared by incubating 0.3 ml of whole blood in 5 ml of supplemented RPMI media for 72 h at 37°C as already described by Lemieux *et al.* [12]. Six hours before harvesting, either MMS, biomaterial extracts solutions or control medium were added to the cultures. After 70 h of incubation, cells were arrested at metaphase using colcemid (0.1 µg/ml; Life Technologies, Grand Island, NY). Two hours later, cells were centrifuged at 2000 rpm for 10 min, resuspended in 0.075 M KCl (Sigma Chemical Co., Mississauga, Canada), and incubated at 37°C for 15 min. The cultures were then centrifuged for another 5 min and fixed 3 times in methanol:acetic acid (3:1) (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Finally, chromosome and nuclei spreads were prepared by letting one drop of the suspension fall onto cold and condensation-covered slides which were then air-dried.

Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL)

Spread chromosomes and nuclei were incubated at 37°C for 30 min in a moist chamber in presence of 100 units of *E. coli* Exo III (Stratagene, LaJolla, CA) in 100µl of incubation buffer. Slides were then thoroughly washed for 15 min in 2X standard saline citrate (2X SSC, pH 7.0) and with phosphate-buffered saline (PBS) for another 15 min. Labeling of chromatin was performed using a multiprimer DNA labeling system kit (Amersham, Oakville, Canada) in which dTTP had been replaced with biotinylated-11-dUTP (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY) at a concentration of 15 µM. The reaction was carried out with 25 µl of the labeling mix in a moist chamber at 37°C for 75 min and was terminated with 100 µl of 0.5M EDTA (pH 8.0; BDH Inc., Toronto, Canada). The

slides were washed with 2X SSC for 5 min, rinsed twice in PBS containing 0.8% human serum albumin (HSA; Bayer Inc., Etobicoke, Canada) for 5 min each, and then incubated with rabbit anti-biotin antibodies (Enzo Diagnostics, diluted 1:100 with PBS 0.8% HSA) for 45 min in a moist chamber at 37°C. They were rinsed again twice in PBS containing 0.8% HSA and incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibodies (Life Technologies, 1:100 PBS 0.8% HSA) for 45 min at 37°C. This step was followed by another 45-min incubation at 37°C with rabbit anti-biotin antibodies, followed by a 45-min incubation with anti-rabbit IgG-colloidal gold complex of 10 nm diameter per particle (Sigma Chemical Co., 1:10 PBS 0.8% HSA). After two washes, the slides were immersed in 3% glutaraldehyde at 4°C for 30 min. Chromatin was dehydrated in an ethanol series (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) and a dichloroethane series (25%, 50%, 70%, 90% and 100%) for 3 min each. The slides were finally coated by a quick dip in 0.5% formvar (J.B.EM Services, Montreal, Canada) dissolved in dichloroethane and allowed to dry horizontally. The chromosomes were then transferred from slides to nickel grids (J.B.EM Services, Montreal, Canada) following Messier *et al.* [13] and examined with transmission electron microscopy operated at 80 kV.

Some MMS-treated and untreated specimens were not digested with Exo III, but were incubated exclusively in the presence of immunogold staining. These controls enabled us to evaluate nonspecific binding to isolated chromatin.

RESULTS

Chromosomes exposed to a mutagenic concentration of MMS demonstrated a high frequency of DNA breaks which resulted in a strong colloidal gold tagging of

metaphase specimens (figure 1a). However, both titanium-exposed (figure 1b) and unexposed chromosomes (figure 1c) produced a comparatively low gold labeling. Moreover, MMS-treated chromosomes showed a significantly higher average gold count per μm^2 chromatin than titanium-exposed metaphases according to a one-factor ANOVA analysis (Table 1). Titanium extracts did not induce a significantly different chromosomal DNA damage labeling than the negative controls (Table 1). All metaphase chromosomes demonstrated uniform staining over the entire chromatin except for centromeric regions which remained unlabeled (figure 1a, b, c).

As compared to metaphases, MMS-exposed interphase nuclei generated strong DNA breakage-associated immunogold tagging which was homogeneously dispersed over the entire nucleic chromatin (figure 2a). Both titanium-treated (figure 2b) and untreated interphase chromatin (figure 2c) also produced homogeneous nuclei labeling, but comparatively low with respect to positive controls. In fact according to a one-factor ANOVA analysis, interphase DNA breaks due to MMS exposition were significantly higher than those resulting from titanium extracts (Table 1). Titanium exposition did not induce a significantly different interphasic labeling than the negative controls (Table 1).

Nuclei in early stages of apoptosis showed nuclear condensation and fragmentation associated with intense gold staining (figure 3). Labeling was here restricted to nuclear degradation vesicles which were associated with areas of high chromatin compaction.

To establish the specificity of this test, a series of control experiments were established. Omission of Exo III treatment with both MMS-exposed and unexposed nuclei and chromosome specimens resulted in a complete lack of colloidal gold tagging (results not shown).

All chromatin material was viewed through its own electron density and showed relatively good ultrastructural preservation. Background and non-specific labeling was almost absent regardless of treatment therefore demonstrating specificity of the technique.

DISCUSSION

Three general mechanisms are believed to account for metal genotoxicity. Metal ions may be the direct cause of DNA injury. Indeed, Beyersmann and Hartwig have shown that metal ions could reach the nucleus of a cell without being captured by ligands [14]. Moreover, metal cations can easily bind to the negatively charged nucleic acid groups such as phosphates and nitrogen bases therefore altering the primary structure and by extension, the three-dimensional architecture of the DNA molecule [15]. Alterations include lesions such as DNA breaks and base deletions [16].

Indirect DNA damage may result from activation of metal intermediates formed in presence of oxygen, hence producing oxidative damage [17]. DNA breakage may also be produced by the release of free and oxygen radicals by metal species in the medium [18]. These latter intermediates would then cause general oxidative damage such as DNA cross-links or hydroxylated nucleic acids [19].

Metals can also react with nuclear proteins such as polymerases causing interference with mechanisms such as DNA replication and DNA repair. Indeed, metals species such as nickel, cobalt, lead and cadmium have been shown to inhibit DNA repair [20,21]. For example, nickel was demonstrated to compete with essential ions such as magnesium which are especially needed at polymerase binding sites for accurate DNA repair function. By interfering with DNA repair, which increases the frequency of DNA damage, metals may also have a comutagenic effect together with environmental agents such as alkylating, UV- and X-irradiation agents [14].

The consequences of metal genotoxicity are numerous. Deletions and substitution mutagenesis for example have been shown to induce proto-oncogene activation and anti-oncogene inactivation. It is also known that activation of proto-oncogenes and inhibition of anti-oncogenes (such as p53: one of the genes triggering apoptosis) leads to neoplasm formation and eventually metastasis production [22]. Therefore, since DNA damage is considered one of the mechanisms responsible for mutation and carcinogenesis [23], it is unfortunate that quantitative *in vitro* methods of genotoxicology studying the different degrees of metal-induced DNA injury are still lacking. In that sense EM-ISEL, which is based on a well-established cell culture technique for human lymphocytes chromosomes, seems to be an assay that responds to an important need in the field of genotoxicity testing.

In order to validate such an assay, the genotoxicity of commercially pure titanium, a well-known and commonly used orthopedic and dental surgery biomaterial,

was investigated. It was used here as a material of reference for the evaluation and standardization of this procedure. This does not imply that no biological reactions are elicited by this material. Titanium is a dense material that was chosen for its comparative value with other potential materials. In fact, the biological reactions to this biomaterial has been extensively studied over the years in both research and clinical practice [24]. The genotoxicity of cpTi was compared to that of MMS: a monofunctional alkylating agent [25] that has been reported to induce DNA SSBs [26] and to cause clastogenic effects such as SCEs even at low concentrations [25,27]. An effective mutagenic but not cytotoxic concentration of MMS allowed us to confirm the accurateness of this test. As predicted MMS-treated chromatin showed a significantly higher proportion of DNA breaks than both biomaterial-exposed and untreated specimens. Moreover, chromosomes in presence of titanium extracts resulted in no differential colloidal gold labeling as compared to untreated negative controls: a similar residual labeling was observed with both experimental conditions. Therefore, titanium was not considered genotoxic. The spontaneous gold staining observed in unexposed chromatin was not surprising, in fact it is rather widely accepted that spontaneous DNA breaks are continuously induced in normal living cells. Fortunately, this residual labeling is present in all cells and negative controls allowed us to easily evaluate it.

An interesting observation, as already reported by Fernandez *et al.* [28], was the fact that metaphase chromatin generated a uniform immunogold labeling at the level of short and long arms while centromeric regions consistently remained unlabeled regardless of the treatment to metaphase chromatin. Taking into account that centromeric regions consist of inactive constitutive heterochromatin regions of the

chromosomes, two hypotheses emerged. First, Fernandez *et al.* hypothesized that this differential labeling at the centromere may be due to the high level of compaction in the heterochromatin associated with histone-like proteins which may protect against availability of genotoxicity agents and therefore against environmentally-induced DNA lesions. Secondly, damage could also be occurring in these central regions but protein association at this level may obstruct accessibility to either Exo III or to the different series of antibodies added, and therefore not allowing us to detect DNA breakage. In fact, Fernandez *et al.* suggest that the highly methylated DNA domains in human lymphocyte chromosomes may bind specific proteins which may act to stabilize their higher order structures. Haaf *et al.* indeed have reported the existence of a non-histone protein specifically associated to constitutive heterochromatin [29]. Fernandez *et al.* also specify that these types of proteins may not be homogeneously distributed in the genome and therefore may interfere differentially depending on DNA nuclease digestion [28].

As opposed to metaphases, most MMS-exposed interphase nuclei showed a high gold labeling over the entire interphasic chromatin. Constitutive heterochromatin seems to be especially prone to breakage and rearrangement [30]. DNA fragmentation was also recognized in a few nuclei showing pyknosis and nuclear condensation. In fact, DNA fragmentation seems to define the early steps of apoptosis, the active process of programmed cell death where cells are extensively and massively degrading their genomic material, even before initial morphologic change and preceding loss of membrane integrity [31]. Indeed, this assay takes advantage of the chromatin multiple DNA breaking points which expose molecular endings at the very initial stages of apoptosis [32,33]. EM-ISEL may therefore become a powerful tool to diagnose cell

mortality. The technique has been performed as well on other types of tissues including in neural cells [34]. It seems to be most importantly not restricted to fresh material as demonstrated in the past by the labeling of a variety of pathological states presenting DNA damage in cells from biopsy and autopsy samples [35]. Therefore, the test may also have a potential application at the histological level, since it can be accomplished on tissue routinely processed for EM [36] whether performed on pre- or post-embedded tissues. Moreover, this protocol may provide an easy way to perform retrospective studies on archived material whether using fresh or fixed tissue which can be valuable to complete a thorough biocompatibility study.

Finally, EM-ISEL does not require the use of traditional chromatin denaturation procedures such as heat, NaOH, or formamide prior to *in situ* hybridization. Indeed, Exo III digestion replaces the latter denaturation step which would otherwise inevitably require additional precautions for potential hazards [37]. Most importantly the test does not require radiolabeled isotopes. According to Gingras and Bendayan [38], biotinylated probes generate a signal more rapidly, with superior morphological preservation, superior spatial resolution and equivalent signal-to-noise ratio. This test also represents an alternative to the detection of UDS using tritiated-thymidine; as opposed to UDS which only shows sites where DNA repair is actively occurring, this procedure has the advantage of directly detecting all DNA breaks including the ones which are concurrently repaired.

CONCLUSION

We have modified and adapted a genotoxicity assay for biomaterial pre-screening. It combines *in situ* end-labeling, immunogold tagging and electron microscopy. It allows precise quantification and localization of induced DNA damage. Labeling can be easily scorable either using an inter-chromosomal or inter-nucleic analysis of the macromolecular distribution of gold particles: both types of analyses seem to respond well to gold staining. This assay constitutes a rapid reproducible non-isotopic protocol that can label *in vitro*-induced genotoxicity taking less than six hours of labeling. We therefore propose this test as a valuable genotoxicity tool for the detection of biomaterial-induced DNA damage *in vitro* with possible applications to histological material. EM-ISEL will therefore be able to assess the genotoxic potential of new materials or medical devices.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Biorthex Inc. (Montréal, Qc, Canada). We thank the Pathology Department (*Hôpital Ste-Justine*, Montréal, Qc, Canada) for EM facilities utilization. MMS controls were kindly supplied by Professor Saroj Chakrabarti (*Université de Montréal*). We also wish to thank Souad Rhalmi, Annie Bilodeau and Louise Laquerre for their competent technical assistance, and Jean Léveillé for his excellent photographic work.

REFERENCES

- [1] D. Sgouras and R. Duncan, Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use: 1 - Use of the tetrazolium-

based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1** (1990), 61-68.

[2] International Organization for Standardization: Biological evaluation of medical devices, International Standard #10993-2 Animal welfare requirements, Geneva: ISO, 1992, pp. 1-5.

[3] M.P. Waalkes, S. Rehn, K.S. Kasprzak and H.Q. Issaq, Inflammatory, proliferative, and neoplastic lesions at the site of metallic identification ear tags in Wistar [CrI:(WI)BR] rats, *Cancer. Res.* **47** (1987), 2445-2450.

[4] K. Takamura, K. Hayashi, N. Ishinishi, T. Yamada and Y. Sugioka, Evaluation of carcinogenicity and chronic toxicity associated with orthopedic implants in mice, *J. Biomed. Mat. Res.* **28** (1994), 583-589.

[5] F.W. Sunderman, Carcinogenicity of Metal Alloys in Orthopedic Prostheses: Clinical and Experimental Studies, *Fundam. Appl. Toxicol.* **13** (1989), 205-216.

[6] G. Ciapetti, E. Cenni, L. Pratelli and A. Pizzoferrato, *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay, *Biomaterials* **14**(5) (1993), 359-364.

[7] M. Tubiana, J. Dutreix and A. Wambersie, eds, *Radiobiologie*, Hermann, Paris, France, 1986, p. 67 (in French).

- [8] E. Snow, Metal Carcinogenesis: Mechanistic Implications, *Pharmacol. Ther.* **53** (1992), 31-65.
- [9] International Organization for Standardization: Biological evaluation of medical devices, International Standard #10993-3 Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity, Geneva: ISO, 1992, pp. 1-8.
- [10] J. Gosalvez, C. Lopez-Fernandez, J.L. Fernandez and V. Goyanes, Oligonucleotide priming in situ to detect induced DNA breaks under electron microscopy; *Trends. Genet.* **9** (1993), 156-157.
- [11] J. Gosalvez, C. Lopez-Fernandez, C. Garcia de la Vega, R. Mezzanotte, J.L. Fernandez and V. Goyanes, Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease, *Genome* **36** (1993), 230-234.
- [12] N. Lemieux, R. Drouin and C.L. Richer, High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study, *Hum. Genet.* **85** (1990), 261-266.
- [13] P.E. Messier, P. Jean and C.L. Richer, Easy transfer of selected mitoses from light to electron microscopy, *Cytogenet. Cell Genet.* **43** (1986), 207-210.

- [14] D. Beyersmann and A. Hartwig, Genotoxic Effects of Metals Compounds, *Arch. Toxicol. Suppl* **16** (1993), 192-198.
- [15] M. Cohen, D. Latta, T. Coogan and M. Costa, Mechanisms of metal carcinogenesis: the reactions of metals with nucleic acids, in: *Biological effects of heavy metals*, Vol. II, E.C. Foulkes, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, pp. 19-75.
- [16] E. Guille, J. Grisvard and I. Sissoeff, Structure and Function of Metallo-DNA in the Living Cell, in: *Systemic Aspects of Biocompatibility*, Vol. II, D.F. Williams, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1981, pp. 33-85.
- [17] K.S. Kasprzak, Possible Role of Oxidative Damage in Metal-Induced Carcinogenesis, *Cancer Investigation* **13**(4) (1995), 411-430.
- [18] M. Floyd, The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis, *Carcinogenesis* **11** (1990), 1447-1450.
- [19] C.B. Klein, K. Frenkel and M. Costa, The role of oxidative processes in metal carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* **4** (1991), 592-604.
- [20] A. Hartwig, R. Schlepegrell and D. Beyersmann, Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.* **241** (1990), 75-82.

- [21] A. Hartwig, R. Schlepegrell and D. Beyersmann, Interactions in nickel mutagenicity: Indirect mechanisms in genotoxicity and interference with DNA repair, in: *Metal Compounds in Environment and Life 4*, E. Merian and W. Haerdi, eds, Science Reviews, Wilmington, 1991, pp. 475-480.
- [22] R.A. Weinberg, Tumor suppressor genes, *Science* **254** (1991), 1138-1146.
- [23] K. Nose and H. Okamoto, Detection of Carcinogen-Induced DNA breaks by Nick Translation in Permeable Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**(2) (1983), 383-389.
- [24] International Organization for Standardization: Biological evaluation of medical devices, International Standard #10993-6 Tests for local effects after implantation, Geneva: ISO, 1994, p.9.
- [25] D.M.F. Salvadori, L.R. Ribeiro and A.T. Natarajan, Effect of beta-carotene on clastogenic effects of mitomycin C, methyl methanesulphonate and bleomycin in Chinese hamster ovary cells, *Mutagenesis* **9**(1) (1994), 53-57.
- [26] G. Brunborg, J.A. Holme and J.K. Hongslo, Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells, *Mutat. Res.* **342** (1995), 157-170.
- [27] A.J. Edwards, E.Y. Moon, D. Anderson and D.B. McGregor, The effect of simultaneous exposure to bromodeoxyuridine and methyl methane sulfonate on sister-

chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes, *Mutat. Res.* **289** (1993), 139-144.

[28] J.L. Fernandez, A. Campos, C. Lopez-Fernandez, J. Gosalvez and V.J. Goyanes, Difference in constitutive heterochromatin behaviour between human amniocytes and lymphocytes detected by sequential in situ exonuclease III digestion-random primer extension procedure, *J. Med. Genet.* **32** (1995), 32-35.

[29] T. Haaf, M. Dominguez-Steglich and M. Schmid, Immuno-cytogenetics VI. A non histone antigen is cell type-specific associated with constitutive heterochromatin and reveals condensation centers in metaphase chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* **50** (1989), 141-144.

[30] E. Therman and M. Susman, eds, *Human Chromosomes: Structure, Behavior, and Effects*, Third edition, Springer-Verlag, New York, 1993, pp. 65-69.

[31] B.W. Stewart, Mechanisms of Apoptosis: Integration of Genetic, Biochemical, and Cellular Indicators, *J. Natl Cancer Inst.* **86**(17) (1994), 1286-1296.

[32] G. Majno and I. Joris, Apoptosis, Oncosis, and Necrosis: An overview of Cell Death, *Am. J. Pathol.* **146**(1) (1995), 3-15.

[33] B. Ansari, P.J. Coates, B.D. Greenstein and P.A. Hall, *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states, *J. Pathol.* **170** (1993), 1-8.

[34] K.A. Wood, B. Dipasquale and R.J. Youle, *In situ* labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum, *Neuron* **11** (1993), 621-632.

[35] A. Migheli, A. Attanasio and D. Schiffer, Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by *in situ* end-labelling techniques, *J. Pathol.* **176** (1995), 27-35.

[36] P.J. Coates, V. Save, B. Ansari and P.A. Hall, Demonstration of DNA damage/repair in individual cells using *in situ* end labelling: association of p53 with sites of DNA damage, *J. Pathol.* **176** (1995), 19-26.

[37] J.L. Fernandez, J. Gosalvez and V.J. Goyanes, Detection of DNA strand breaks induced by hydroxyl radicals in nuclear and chromosomal chromatin by electron microscopy, *Cytobios* **73** (1993), 189-195.

[38] D. Gingras and M. Bendayan, Colloidal Gold Electron Microscopic In Situ Hybridization: Combination with Immunocytochemistry for the Study of Insulin and Amylase Secretion, *Cell Vision* **2**(5) (1995), 218-224.

Table 1. *In vitro* DNA damage as measured using the EM-ISEL assay.

<u>Material</u>	Average immunogold particles/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$	
	<i>Chromatin type</i> <i>Metaphasic</i> (chromosomes)	<i>Interphasic</i> (nuclei)
MMS	122.8 \pm 15	72.5 \pm 15
CpTi	31.3 \pm 7*	33.8 \pm 9*
Culture medium	23.5 \pm 6*	23.5 \pm 4*

*: statistically different from positive controls ($p < 0.05$, one-factor ANOVA)

FIGURE CAPTIONS

Figure 1a, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of MMS-exposed lymphocyte metaphase chromosome (X10 000). **b**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of cpTi-exposed lymphocyte metaphase chromosome (X10 000). **c**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of untreated lymphocyte metaphase chromosome (X10 000).

Figure 2a, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of MMS-exposed lymphocyte interphase nuclei (X10 000). **b**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of cpTi-exposed lymphocyte interphase nuclei (X10 000). **c**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of untreated lymphocyte interphase nuclei (X10 000).

Figure 3 Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of MMS-exposed lymphocyte apoptotic nuclei (X10 000).

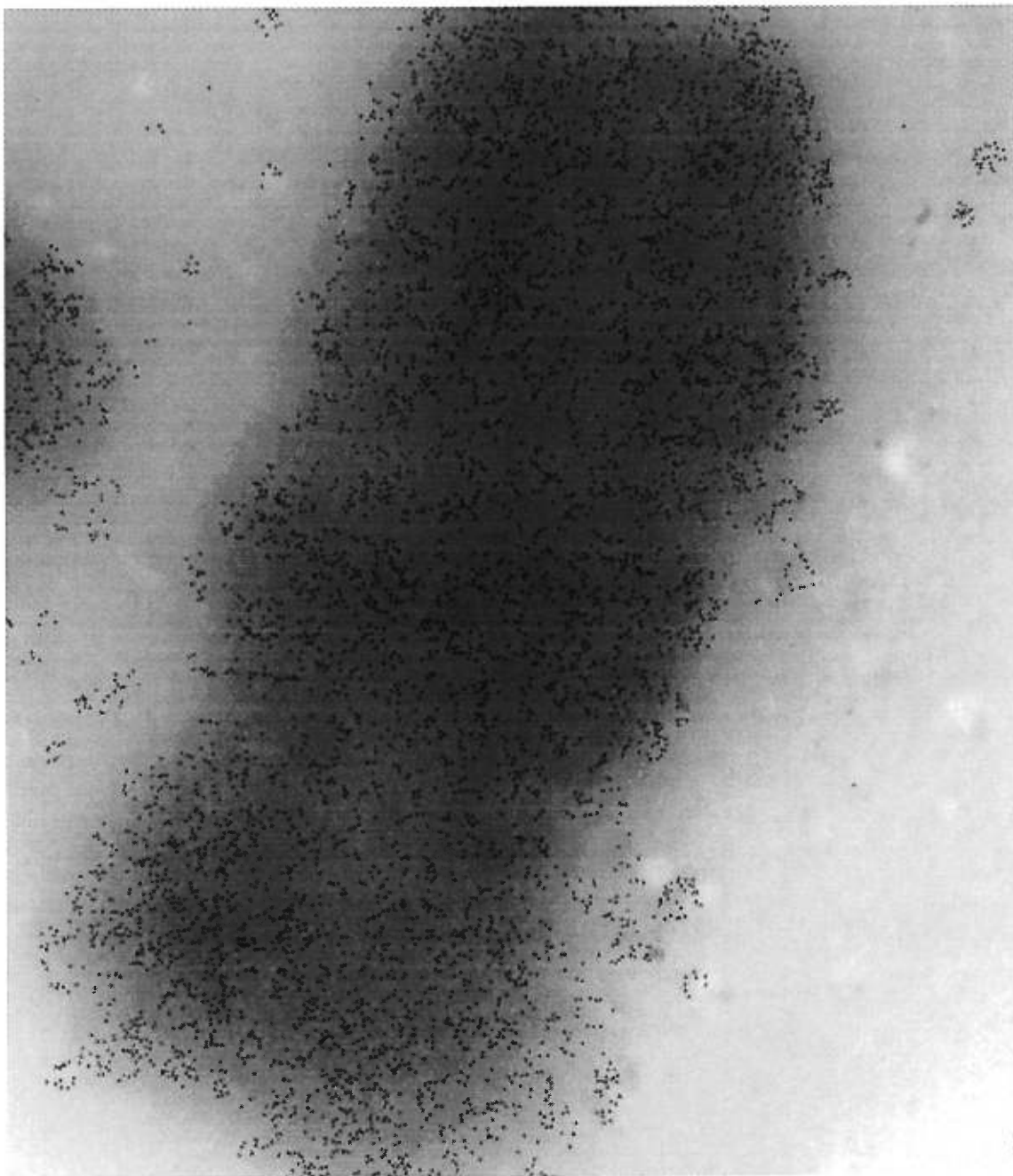


Figure 1a : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.

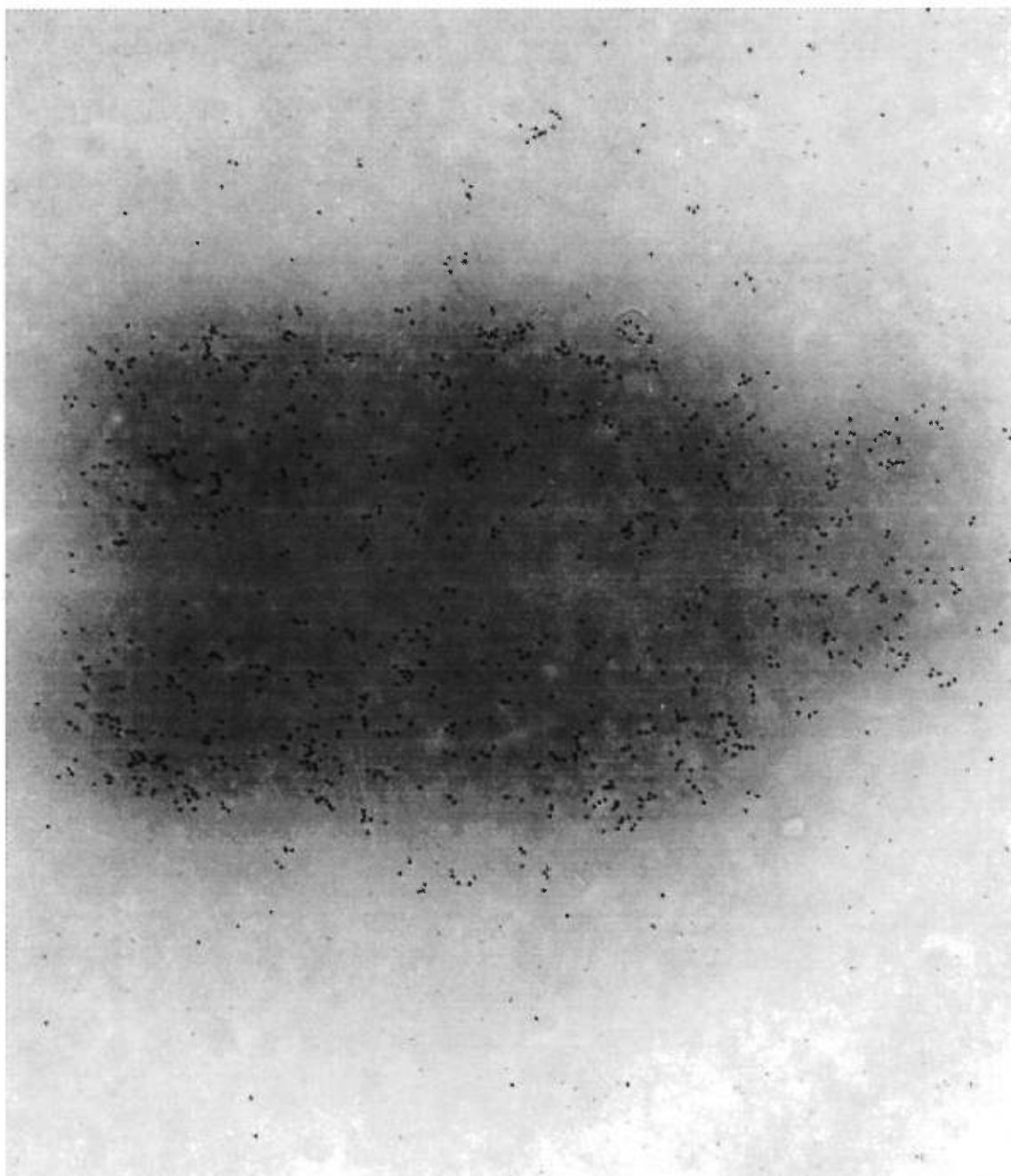


Figure 1b : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.

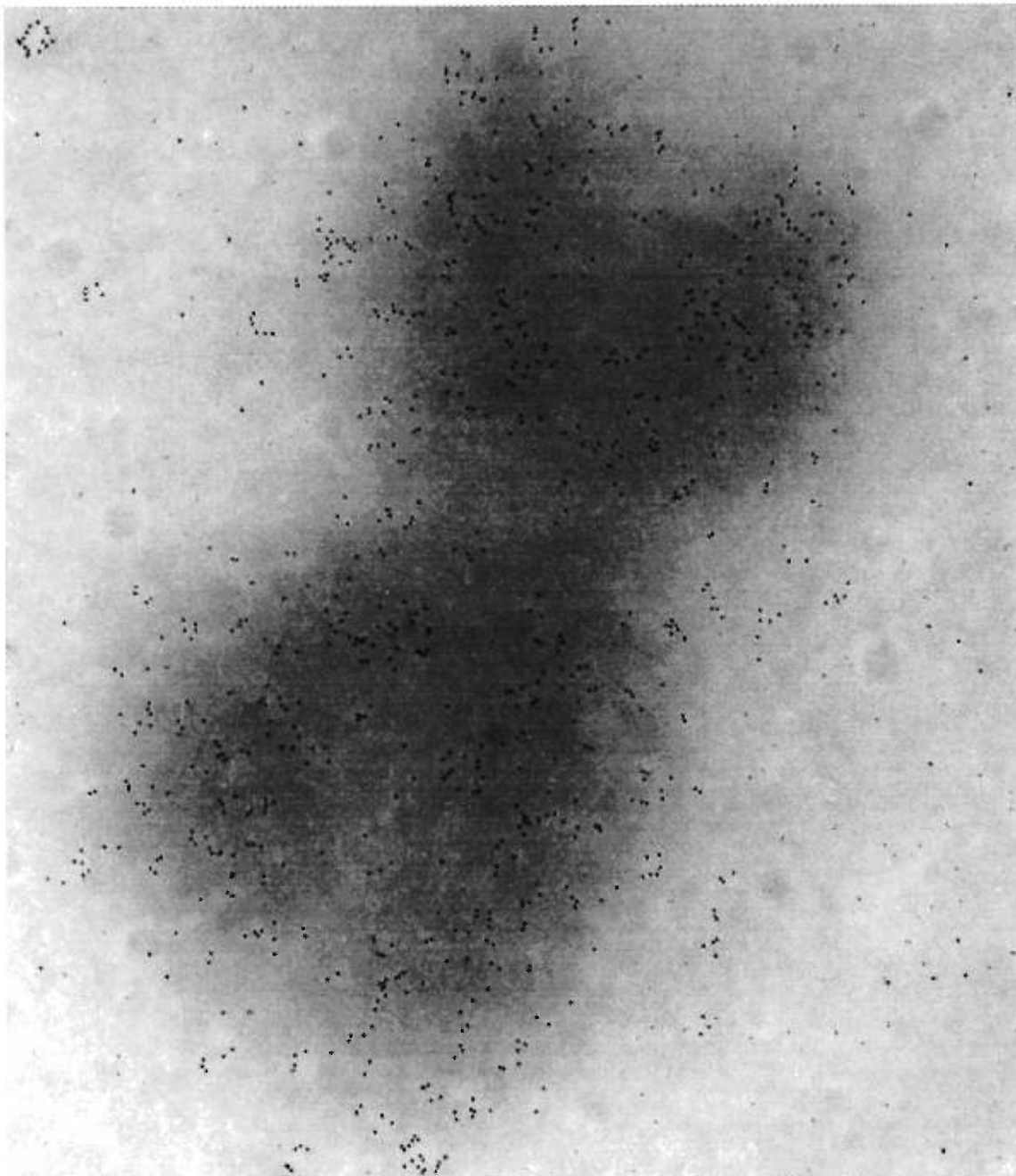


Figure 1c : Chromosome métaphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.

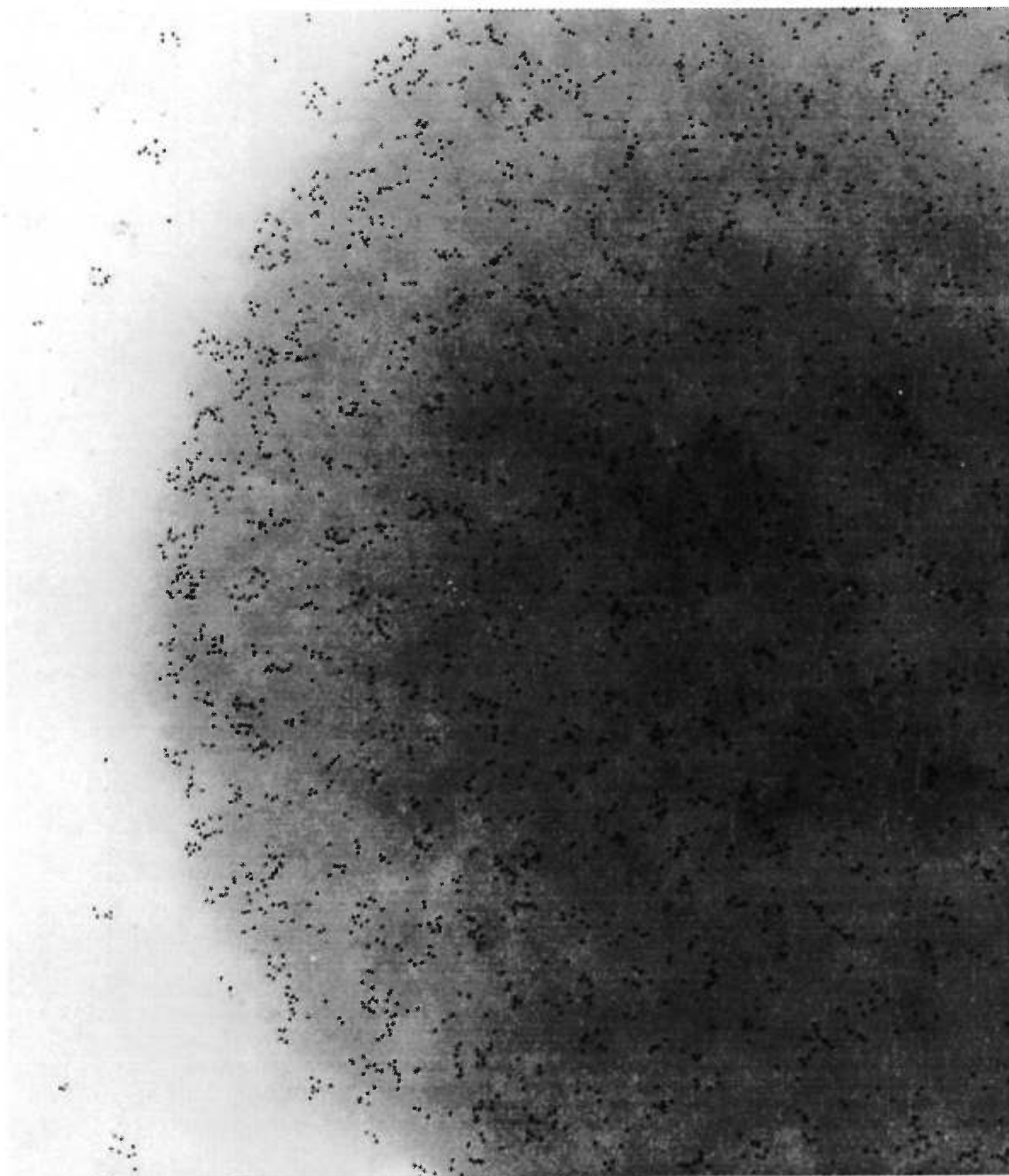


Figure 2a : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.



Figure 2b : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.

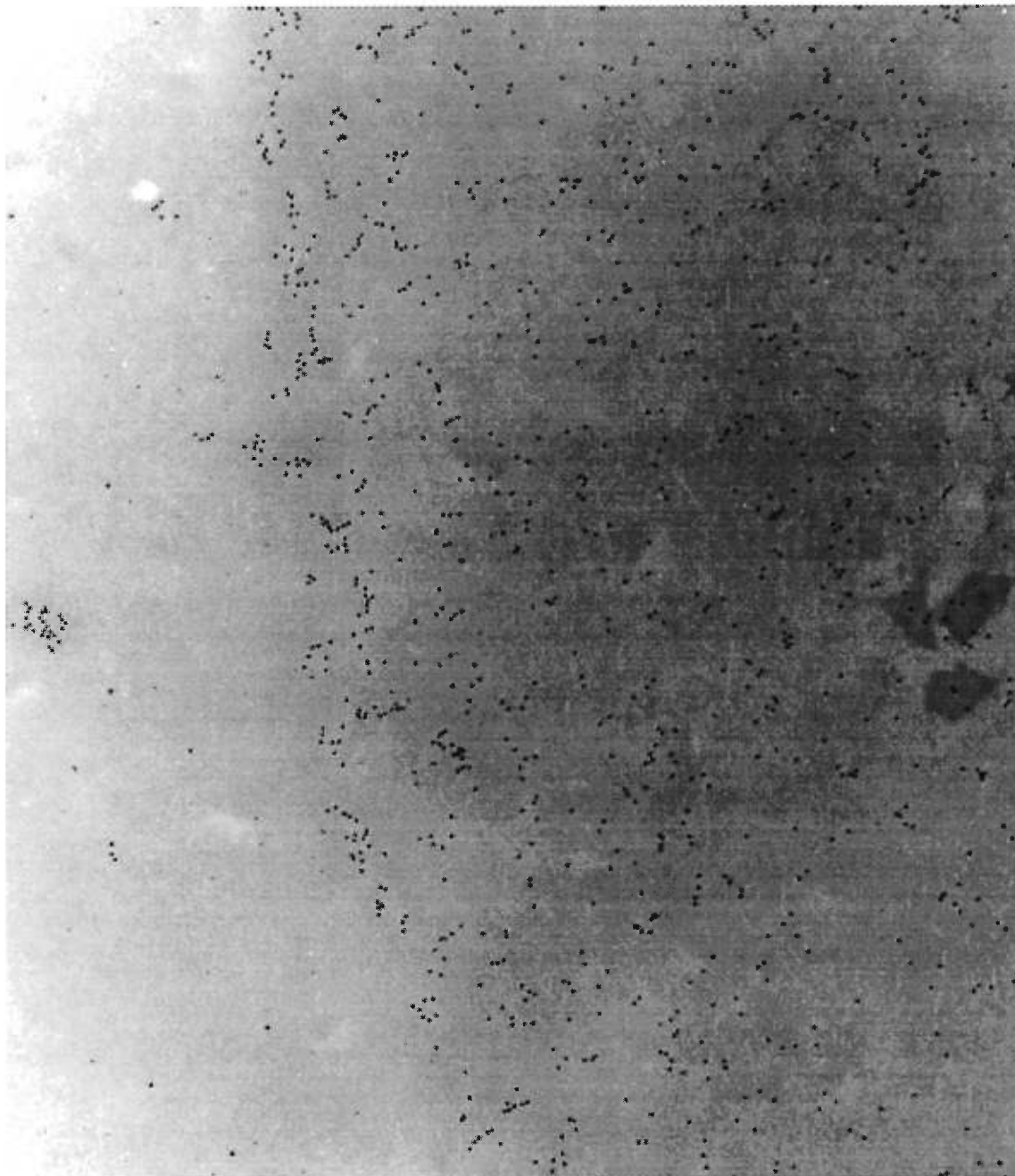


Figure 2c : Noyau interphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.

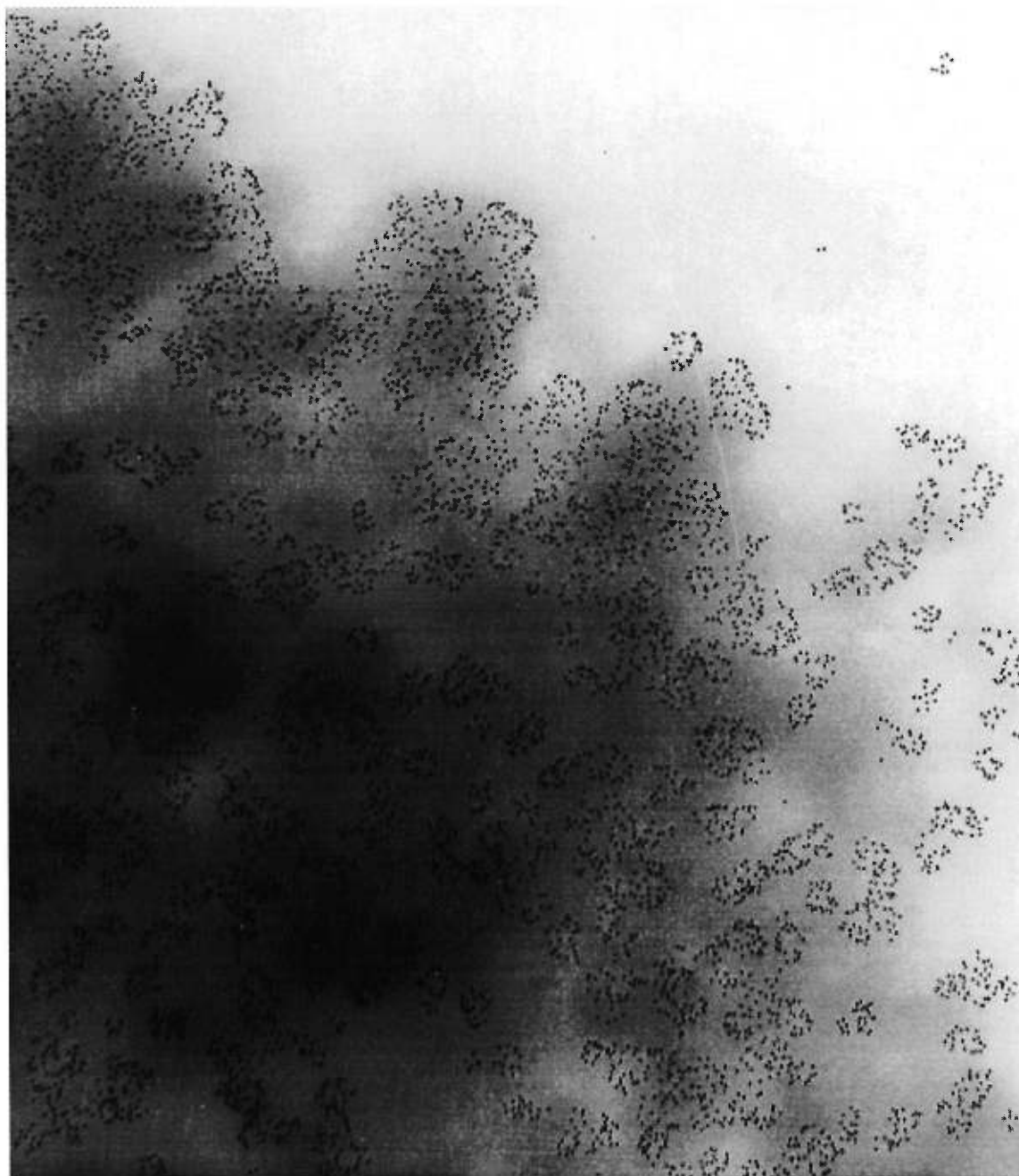


Figure 3 : Noyau apoptotique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.

CHAPITRE 2

MISE EN PRATIQUE DE L'ESSAI EM-ISEL AVEC L'ALLIAGE NICKEL-TITANE (ARTICLE 2)

“In Vitro Biocompatibility Assessment of a Nickel-Titanium Alloy using Electron Microscopy In Situ End-Labeling (EM-ISEL)” Assad M., Yahia L'H., Rivard C.H., Lemieux N., Journal of Biomedical Materials Research, 41(1), pp.154-161, 1998.

Le manuscrit fut soumis à l'éditeur-en-chef le 4 novembre 1997 et il a été accepté le 17 décembre 1997.

ABSTRACT

Shape memory nickel-titanium (NiTi) alloys are potential candidates for biomedical applications. However, their equiatomic composition (50 wt% Ni) is controversial, and concerns have been raised about their biocompatibility level because of the carcinogenicity potential. The relative *in vitro* genotoxicity of NiTi was therefore evaluated and compared to commercially pure titanium (cpTi), 316L stainless steel (SS 316L), and positive and negative controls. To do so, human peripheral blood lymphocytes were cultured in semiphysiological medium that had been previously exposed to the biomaterials. The electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) assay was then performed in order to provide quantification of *in vitro* chromatin DNA single-stranded breaks (SSBs). Chromosomes and nuclei, were harvested and exposed to exonuclease III, which amplifies DNA lesions at 3' ends of breaks. After random priming, incorporation of biotin-dUTP was labeled by immunogold binding, which was then detected using electron microscopy. Cellular chromatin exposed to the positive control demonstrated a significantly stronger immunogold labeling than when it was exposed to NiTi, cpTi, SS 316L extracts, or the untreated control. Moreover, gold particle counts, whether in the presence of NiTi, cpTi, or the negative control medium, were not statistically different. NiTi genocompatibility therefore presents promising prescreening results towards its biocompatibility approval.

KEY-WORDS

nickel-titanium; biocompatibility; genotoxicity; immunogold labeling; electron microscopy

RUNNING HEADLINE

Genotoxicity Testing of a Nickel-Titanium Alloy

INTRODUCTION

New biomaterials constantly are being developed to respond to the need for better mechanical properties. A good example is the increasing worldwide interest in the potential use of shape memory and superelastic nickel-titanium (NiTi) alloys for biomedical applications. Indeed, NiTi shape memory alloy (SMA) devices, with their capacity to revert to original shape at specific temperatures, their high fatigue life, their low corrosion level, and their superior wear, have attracted the interest of biomaterials scientists and clinicians in many disciplines, including dentistry, orthopedics, traumatology, cardiology, neurology, and urology.

The shape memory effect was first introduced by Buehler *et al.*¹ in 1963. Nitinol (named for Nickel-Titanium Naval Ordnance Laboratory) was later studied and developed in Silver Springs, MD, for its antimagnetic properties and its high salt water corrosion resistance in oceanic underwater operations^{2,3}. Andreason and Hilleman⁴ introduced nickel-titanium orthodontic wires in dentistry in 1971. They were especially interested in their high springback, high resilience and low stiffness qualities. Johnson *et al.*⁵ later applied nitinol properties to develop a bone plate in order to provide rigid internal fixation without using external clamping devices. Schmerling *et al.*⁶ then showed the potential usefulness of nitinol as a Harrington rod treatment for scoliosis, which has given birth to many investigations on scoliosis surgical correction systems^{7,8,9}.

The composition of these alloys, which includes nearly 50% Ni, is, however, controversial, and concerns have been raised about their use for biomaterial applications. Recent studies have shown nickel to be responsible for systemic effects such as allergy, dermatitis, and asthma^{10,11}. And nickel-induced carcinogenesis has also been extensively studied but still remains an enigmatic issue^{12,13,14}. Since the stability provided by covalent-like bonds between titanium and nickel atoms is hypothetical, the carcinogenic potential of nickel-titanium certainly constitutes a serious interest: genotoxicity and carcinogenicity assays need to play an important role in a systematic biocompatibility investigation of NiTi.

The purpose of this study was therefore to quantify the relative *in vitro* genotoxicity of nickel-titanium in order to clarify whether or not it represents a potential hazard to DNA molecules. To do so, we evaluated the proportional differences of chromatin single-stranded breaks (SSBs) induced by NiTi extracts as compared to current orthopedic biomaterials. NiTi relative genotoxicity in semiphysiological conditions was evaluated using both metaphase chromosomes and interphase nuclei.

MATERIALS AND METHODS

Biomaterials Extraction

Following ISO 10993-3 sample preparation conditions,¹⁵ equiatomic nickel-titanium (Memometal, France), commercially pure titanium (cpTi; Titanium Limited, Montreal, Canada), and 316L stainless steel rods (SS 316L; Howmedica, New York, NY) were reduced to standardized particles ($250 \mu\text{m} < \phi < 500 \mu\text{m}$) and extracted (0.2 g biomaterial/mL of media) at 37°C for 24 h in RPMI-1640 medium (Life Technologies,

Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies, Grand Island, NY), 1% glutamine (Mediatech, Herndon, VA), 0.1% gentamicin (Schering, Montreal, Canada), and 1% phytohaemagglutinin (Murex Diagnostics, Dartford, England). The resulting media were then filtered at 0.2 μm . Untreated and methyl methanesulfonate (MMS)-treated (1 mM; Aldrich, Milwaukee, WI) supplemented RPMI media were also established as negative and positive controls, respectively.

Cell culture

Human peripheral blood samples were obtained from a young healthy donor. Lymphocytes were prepared by incubating 0.3 mL of whole blood in 5 mL of supplemented RPMI media for 72 h at 37°C, as already described by Lemieux *et al.*¹⁶ Six hours before harvesting, either the MMS positive control, biomaterial extract solutions or control medium were added to the cultures. After 70 h of incubation, cells were arrested at metaphase using colcemid (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Life Technologies, Grand Island, NY). Two hours later, cells were centrifuged at 2000 rpm for 10 min, resuspended in 0.075M of KCl (Sigma Chemical Co., Mississauga, Canada), and incubated at 37°C for 15 min. The cultures were then centrifuged for another 5 min and fixed 3 times in methanol:acetic acid (3:1, Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Finally, chromosomes and nuclei spreads were prepared by letting one drop of the suspension fall onto cold and condensation-covered slides, which were then air-dried.

***In situ* end-labeling (ISEL)**

In order to provide quantification of *in vitro* chromatin DNA breakage, the electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) assay was then performed

following Assad *et al.*¹⁷ Spread chromosomes and nuclei were incubated at 37°C for 30 min in a moist chamber in the presence of 100 units of *E. coli* Exo III (Stratagene, LaJolla, CA) in 100 µL of incubation buffer. Slides were then thoroughly washed with 2X standard saline citrate (2X SSC, pH 7.0) for 15 min and with phosphate-buffered saline (PBS) for another 15 min. Labeling of chromatin was performed using a multiprimer DNA labeling system kit (Amersham, Oakville, Canada) in which dTTP had been replaced by biotinylated-11-dUTP (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY) at a concentration of 20 µM. The reaction was carried out with 25 µl of the labeling mix in a moist chamber at 37°C for 75 min and was terminated with 100 µl of 0.5M EDTA (pH 8.0; BDH Inc., Toronto, Canada). The slides were washed with 2X SSC for 5 min, rinsed twice in PBS containing 0.8% human serum albumin (HSA; Bayer Inc., Etobicoke, Canada) for 5 min each, and then incubated with rabbit anti-biotin antibodies (Enzo Diagnostics, diluted 1:100 PBS with 0.8% HSA) for 45 min in a moist chamber at 37°C. They were rinsed again twice in PBS containing 0.8% HSA and incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibodies (Life Technologies, 1:100 PBS with 0.8% HSA) for 45 min at 37°C. This step was followed by another 45-min incubation at 37°C with rabbit anti-biotin antibodies, and by a 45-min incubation with anti-rabbit IgG-colloidal gold complex of 10 nm in diameter per particle (Sigma Chemical Co., 1:10 PBS with 0.8% HSA). After two washes, slides were immersed in 3% glutaraldehyde at 4°C for 30 min. Chromatin was dehydrated in an ethanol series (30, 50, 70, 90 and 100%) and a dichloroethane series (25, 50, 70, 90 and 100%) for 3 min each. The slides were finally coated by a quick dip in 0.5% formvar (J.B.EM Services, Montreal, Canada) dissolved in dichloroethane and allowed to dry vertically. Chromatin materials were then

transferred from the slides to nickel grids (J.B.EM Services, Montreal, Canada) following Messier *et al.*¹⁸.

Electron Microscopy

Chromosomes and nuclei on nickel grids were observed using a Philips EM208 (Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands) operated at 60 kV.

Immunogold counting

Gold particle counts analyses were performed using the public domain NIH Image program developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.

Statistical analysis

One-way analyses of variance (ANOVA) were performed to determine if any statistically significant difference in immunogold labeling existed among the biomaterials (or controls). Scheffe's F tests were used as post *hoc* analyses to determine which specific biomaterial (or control) induced statistically different gold binding to either interphase nuclear chromatin or metaphase chromosomal chromatin. Differential gold staining between chromatin types, interphase nucleus chromatin vs. metaphase chromosome chromatin, was compared using a two-way ANOVA. Biomaterials were not considered genotoxic if they showed a significantly lower immunogold labeling than the positive control, while eliciting a gold binding similar to that of the negative control medium.

RESULTS

Interphase chromatin (Fig. 1) demonstrated a significant difference in DNA breakage between materials (ANOVA, $p < 0.0001$). A Scheffe comparison F test showed differences in the number of immunogold particles (IGPs) per μm^2 chromatin between the positive controls (mean IGPs = 397) and all the other groups (Table 1): NiTi (mean IGPs = 94), cpTi (mean IGPs = 97), SS 316L (mean IGPs = 122) and negative controls (mean IGPs = 94). No statistically significant differences in labeling was observed among NiTi, cpTi, SS 316L, or the negative controls (Table 1).

Metaphase chromatin (Fig. 2) showed a significant difference in genotoxicity induction between materials (ANOVA, $p < 0.0001$). A Scheffe F test demonstrated a difference between positive controls (mean IGPs = 346) and all the other groups (Table 2): NiTi (mean IGPs = 157), cpTi (mean IGPs = 156), SS 316L (mean IGPs = 238) and negative controls (mean IGPs = 157). No statistically significant difference was observed among NiTi, cpTi, or the negative controls. 316L stainless steel (mean IGPs = 238) induction of DNA strand breaks on metaphase chromatin was significantly higher than the ones elicited by nickel-titanium, commercially pure titanium, and the negative controls (Table 2).

A significant difference in DNA damage between interphase nucleus chromatin and metaphase chromosome chromatin was observed: 161 and 217 IGPs/ μm^2 chromatin, respectively (ANOVA, $p < 0.0001$). Nonspecific labeling was almost absent regardless of treatment.

DISCUSSION

We have evaluated the relative genocompatibility potential of an equiatomic nickel-titanium alloy compared to titanium and stainless steel, two of the most widely used metallic biomaterials in orthopedic surgery. Both titanium^{19,20} and 316L stainless steel²¹ are considered biocompatible and therefore represent good comparison tools for the *in vitro* evaluation of the potential candidate biomaterial nickel-titanium. *In vitro* cell response to NiTi has not been well monitored in the past. Apart from Putters *et al.*, who showed that NiTi inhibition of mitosis was equivalent to that of titanium²², few systematic biocompatibility investigations have included parallel *in vitro* assays. Moreover, ISO has published standardized techniques for a complete biocompatibility evaluation. It allowed us to conclude to a similar cytocompatibility of NiTi with respect to CoCrMo^{23,24}. Recently, Wever *et al.* demonstrated a cytotoxicity and genotoxicity of NiTi that is comparable to that of 316L stainless steel²⁵. Our team has however suspected the leaking of a cytotoxic substance after having performed the unscheduled DNA synthesis (UDS) assay using tritiated thymidine incorporation²³.

UDS detection may give us a hint about potential lesions and DNA repair, but few quantitative *in vitro* genetic toxicology tests directly localize and quantify both DNA damage and DNA repair at the electron microscopy level. We therefore have used the EM-ISEL assay that combines *in situ* hybridization, immunogold labeling, and electron microscopy to allow a precise detection of DNA strand breakage¹⁷. EM-ISEL constitutes a rapid nonisotopic protocol for the detection of DNA SSBs induced by NiTi extracts in white blood cells. Indeed, nickel ion genotoxicity may consist in interaction with heterochromatin regions of the chromatin producing DNA-protein crosslinks, DNA

strand breaks, and chromosome damage^{13,14,26-28}. Moreover, nickel ions seem to cause DNA damage and interference with DNA repair, two important steps involved in carcinogenesis initiation²⁷.

We used human lymphocytes to determine this potential genotoxicity. To our knowledge, NiTi biocompatibility has not been tested on lymphocytes, which represent the effector cells of the immune response²⁹. They are therefore considered important targets to evaluate immuno-cytotoxicity, being known to accumulate in chronic inflammatory lesions²¹. Isolated chromatin material from these lymphocytes also permitted the evaluation of DNA damage in the nucleus, an accurate indicator of cell lethality³⁰. EM-ISEL labeling was scorable either using an inter-nucleic (Table 1) or inter-metaphasic (Table 2) analysis.

According to the EM-ISEL assay, NiTi induction of SSBs was statistically different from the induction caused by the positive control both in the internucleic and the intermetaphasic analyses. NiTi did not demonstrate a significantly different genocompatibility level than cpTi or the semiphysiological medium itself, regardless of the chromatin type used. Surprisingly, SS 316L elicited more IGPs than both cpTi and NiTi on metaphase chromatin. A recent study by Ryhanen *et al.*³¹ reports correlating findings: the average proliferation of osteoblasts is almost the same in the presence of NiTi, SS 316L, or cpTi, but their light microscopy observation nevertheless demonstrated a higher inhibition of cell growth in the presence of stainless steel than in the case of either NiTi or cpTi.

The fact that SS 316L could induce a higher proportion of DNA damage than NiTi may sound astonishing since on average, SS 316L contains 10-14 wt% Ni while the NiTi material used here was equiatomic (50 wt% Ni). However, Duerig *et al.* recently reported that NiTi is chemically more stable and less corrosive than 316L stainless steel³². Also Barrett *et al.* observed a significantly higher nickel release by stainless steel compared to nickel-titanium after 14 days in the presence of artificial saliva¹¹. They however speculated that it was most likely a random occurrence. Few hypotheses have emerged to explain the potentially higher genotoxicity of SS 316L compared to NiTi. An intermetallic state of Ni and Ti atoms could provide that higher stability in NiTi specimens and therefore a lower solubility of nickel ions than in the case of stainless steel. Additionally, the presence of other elements, such as chromium ions (16-18 wt% Cr) in SS 316L could increase the genotoxicity level in semiphysiological conditions. Chromium has been identified in the past as a strong genotoxic element, inducing DNA strand breaks, base damage, and DNA-protein crosslinks²⁷.

Moreover, Barrett *et al.* have demonstrated the relatively low biodegradation of nickel from NiTi alloys with respect to average dietary intake: average total release during a 4-week period was approximately one tenth the reported daily dietary intake¹⁰. This study was followed by that of Bishara *et al.*, who have shown that in orthodontic therapy, nickel-titanium may not necessarily corrode enough in an aqueous environment to release a significant amount of nickel¹¹. Indeed, they have found no significant increase in the blood levels of nickel. Using atomic absorption spectrophotometry (AAS), analyses of blood samples from preclinical evaluation would definitely assess the release of Ni in blood associated to NiTi orthopedic applications. Corrosion studies

are under parallel investigation in our laboratory³³ and will certainly help us determine the relationship between NiTi biodegradation and its carcinogenic potential.

A few qualitative animal studies on nickel-titanium have additionally been reported in the literature. Berger-Gorbet *et al.* used immunostaining of osteonectin and concluded to a slower osteogenesis bone response in rabbits with NiTi as opposed to CoCrMo, cpTi, and stainless steel³⁴. However, surface state control had not been clearly shown and bad surface quality is suspected in that case³⁵. Takeshita *et al.* showed that NiTi implants induced a significantly lower percentage of bone contact than TiAlV, cpTi, or anodic oxidized titanium³⁶. However, most investigations on tissue reactions elicited by NiTi indicate a favorable compatibility. Indeed Cutright *et al.*, from the U.S. Army Institute of Dental Health, concluded that stainless steel and NiTi elicited comparable subcutaneous reactions in rats³⁷. Castleman *et al.* analyzed bone and muscle reactions to NiTi with respect to a CoCr alloy and concluded there is nitinol compatibility in dog tissue³⁸. Oonishi *et al.* observed cortical bone formation areas in contact with NiTi stems 4 weeks after implantation in sheep and found no adverse pathological inflammation reactions³⁹. Finally, Simske and Sachdeva demonstrated less total apposition and more total ingrowth after porous NiTi implantation in rabbit cranial and frontal bone compared with hydroxyapatite (HA)⁴⁰. Nickel-titanium therefore represents a promising biomaterial candidate, and more systematic biocompatibility studies, including *in vitro* biological pre-screening, will have to be undertaken in the near future.

CONCLUSIONS

This study has revealed a relative genocompatibility of equiatomic nickel-titanium when compared to metallic biomaterials currently used in orthopedics. NiTi was less genotoxic to metaphase chromosomes than was SS 316L, which also contains a significant amount of Ni. NiTi induced a significantly lower immunogold labeling than the MMS positive control, recognized for its genotoxic potential. Therefore, this cell culture response in the presence of nickel-titanium is satisfactory. However, this study has not established the definite biocompatibility of nickel-titanium. Relationships between genotoxic potential and corrosion levels need to be evaluated in the near future. Furthermore, nickel-titanium genotoxicity level will have to be compared with cytotoxicity and sensitization levels, and there will need to be animal implantation tests. The latter assays could be followed by preclinical evaluation in order to draw definite conclusions on nickel-titanium biocompatibility as a permanent implant material for bone and other tissues used in orthopedic surgery.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported financially by the Biomechanics/Biomaterials Research Group (*École Polytechnique*, Montréal). We thank the Pathology Department (*Hôpital Ste-Justine*, Montréal) for utilization of their EM facilities. The MMS control was kindly supplied by Professor S. Chakrabarti. We also wish to thank S. Rhalmi, A. Bilodeau, and F. Fortin for their competent technical assistance, and J. Léveillé for his excellent photographic work.

REFERENCES

1. W.J. Buehler, J.V. Gilfrick, and R.C. Wiley, "Effects of low temperature phase changes on the mechanical properties of alloys near composition TiNi," *J. Appl. Phys.*, **34**, 1475-1477 (1963).
2. W.J. Buehler and F.E. Wang, "A summary of Recent Research on the Nitinol Alloys and Their Potential Applications in Ocean Engineering," *Ocean Eng.*, **1**, 105-120 (1968).
3. S. Civjan, E.F. Huget, and L.B. DeSimon, "Potential Applications of Certain Nickel-Titanium (Nitinol) Alloys," *J. Dent. Res.*, **54**, 89-96 (1975).
4. G.F. Andreasen and T.B. Hilleman, "An evaluation of 55-cobalt substituted Nitinol wire for use in orthodontics," *J. Am. Dent. Assoc.*, **82**, 1373-1375 (1971).
5. A.A. Johnson and F.P. Alicandri, "Thermoconstrictive Surgical Appliance," U.S. Patent No. 3,786,806, January 2, 1974.
6. M.A. Schmerling, M.A. Milkov, A.E. Sanders, and J.E. Woosley, "Using the Shape Recovery of Nitinol in the Harrington Rod Treatment of Scoliosis," *J. Biomed. Mater. Res.*, **10**, 879-892 (1976).
7. P.P.F. Kuo, P.J. Yang, Y.F. Zhang, H.B. Yang, Y.F. Yu, K.R. Dai, W.Q. Hong, M.Z. Ke, T.D. Cai, and J.C. Tao, "The Use of Nickel-Titanium Alloy in Orthopedic Surgery in China," *Orthopedics*, **12**, 111-116 (1989).

8. J.O. Sanders, A.E. Sanders, R. More, and R.B. Ashman, "A Preliminary Investigation of Shape Memory Alloys in the Surgical Correction of Scoliosis," *Spine*, **18**, 1640-1646 (1993).
9. K. Matsumoto, N. Tajima, and S. Kuwahara, "Correction of Scoliosis with Shape-memory Alloy," *J. Jpn. Orthop. Assoc.*, **67**, 267-274 (1993).
10. R.D. Barrett, S.E. Bishara, and J.K. Quinn, "Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium *in vitro*," *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, **103**, 8-14 (1993).
11. S.E. Bishara, R.D. Barrett, and M.I. Selim, "Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel," *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, **103**, 115-119 (1993).
12. J.K. Dunnick, M.R. Elwell, A.E. Radovsky, J.M. Benson, F.F. Hahn, K.J. Nikula, E.B. Barr, and C.H. Hobbs, "Comparative Carcinogenic Effects of Nickel Subsulfides, Nickel Oxide, or Nickel Sulfate Hexahydrate Chronic Exposures in the Lung," *Cancer Res.*, **55**, 5251-5256 (1995).
13. A. Hartwig, I. Kruger, and D. Beyersmann, "Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair," *Toxicology Lett.*, **72**, 353-358 (1994).

14. A. Hartwig, L.H.F. Mullenders, R. Schlepegrell, U. Kasten, and D. Beyersmann, "Nickel(II) Interferes with the Incision Step in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells," *Cancer Res.*, **54**, 4045-4051, (1994).
15. International Organization for Standardization, *Biological evaluation of medical devices, International Standard #10993-3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity*, 1st ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, pp.1-8, 1992.
16. N. Lemieux, R. Drouin, and C.L. Richer, "High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study," *Hum. Genet.*, **85**, 261-266 (1990).
17. M. Assad, N. Lemieux, and C.H. Rivard, "Immunogold Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL) Assay for Biomaterial DNA Damage Detection," *Biomed. Mater. Eng.*, **7**, 391-400 (1997).
18. P.E. Messier, P. Jean, and C.L. Richer, "Easy transfer of selected mitoses from light to electron microscopy," *Cytogenet. Cell Genet.*, **43**, 207-210 (1986).
19. K. Bordji, J.Y. Jouzeau, D. Mainard, E. Payan, P. Netter, K.T. Rie, T. Stucky, and M. Hage-Ali, "Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts," *Biomaterials*, **17**, 929-940 (1996).

20. W.C. Head, D.J. Bauk, and R.H. Emerson Jr., "Titanium As the Material of Choice for Cementless Femoral Components in Total Hip Arthroplasty," *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **311**, 85-90 (1995).
21. K. Takamura, K. Hayashi, N. Ishinishi, T. Yamada, and Y. Sugioka, "Evaluation of carcinogenicity and chronic toxicity associated with orthopedic implants in mice," *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 583-589 (1994).
22. J.L.M. Putters, D.M.K.S. Kaulesar Sukul, G.R. de Zeeuw, A. Bijma, and P.A. Besselink, "Comparative Cell Culture Effects of Shape Memory Metal (Nitinol[®]), Nickel and Titanium: A Biocompatibility Estimation," *Eur. Surg. Res.*, **24**, 378-382 (1992).
23. M. Assad, E.A. DesRosiers, L'H. Yahia, and C.H. Rivard, "Cytocompatibility testing of the Shape-Memory Nickel-Titanium (NiTi) Alloy," in *Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Society For Biomaterials in conjunction with the 26th International Biomaterials Symposium*, Boston, Massachusetts, 1994, p. 297.
24. M. Assad, L'H. Yahia, E.A. DesRosiers, S. Lombardi, and C.H. Rivard, "Cytocompatibility testing of Nickel-Titanium," in *Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, and T. Duerig (eds.), Monterey, California, 1995, pp.215-220.

25. D.J. Wever, A.G. Veldhuizen, M.M. Sanders, J.M. Schakenraad, and J.R. van Horn, "Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy," *Biomaterials*, **18**, 1115-1120 (1997).
26. F.W. Sunderman, "Carcinogenicity of Metal Alloys in Orthopedic Prostheses: Clinical and Experimental Studies," *Fundam. Appl. Toxicol.*, **13**, 205-216 (1989).
27. E. Snow, "Metal Carcinogenesis: Mechanistic Implications," *Pharmacol. Ther.*, **53**, 31-65 (1992).
28. D. Beyersmann and A. Hartwig, "Genotoxic Effects of Metals Compounds," *Arch. Toxicol.*, **Suppl. 16**, 192-198 (1993).
29. G.S. Carvalho and I. Bravo, "*In vitro* immuno-cytotoxicity of iron evaluated by DNA synthesis of human T lymphocytes stimulated via CD2 and CD3," *J. Mat. Sc. Mater. Med.*, **4**, 366-371 (1993).
30. M. Tubiana, J. Dutreix, and A. Wambersie, eds., *Radiobiologie*, Hermann, Paris, France, 1986, p.67.
31. J. Ryhanen, E. Niemi, W. Serlo, E. Niemela, P. Sandvik, H. Pernu, and T. Salo, "Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures," *J. Biomed. Mater. Res.*, **35**, 451-457 (1997).

32. T.W. Duerig, A.R. Pelton, and D. Stockel, "Superelastic Nitinol for Medical Devices," *Med. Plastics Biomater.*, **4**, 30-43 (1997).
33. F. Villiermaux, M. Tabrizian, L'H. Yahia, G. Czeremuskin, and D. Piron. "Corrosion resistance improvement of NiTi Osteosynthesis Staples by Plasma Polymerized Tetrafluoroethylene Coating," *Biomed. Mater. Eng.*, **6**, 241-254 (1996).
34. M. Berger-Gorbet, B. Broxup, C.H. Rivard, and L'H. Yahia, "Biocompatibility testing of NiTi screws using immunohistochemistry on sections containing metallic implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 243-248 (1996).
35. L'H. Yahia, Unpublished data.
36. F. Takeshita, H. Takata, Y. Ayukawa, and T. Suetsugu, "Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol)," *Biomaterials*, **18**, 21-25 (1997).
37. D.E. Cutright, S.N. Bhaskar, B. Perez, R.M. Johnson, and G.S.M. Cowan, "Tissue reaction to nitinol wire alloy," *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **35**, 578-584 (1973).
38. L.S. Castleman, S.M. Motzkin, F.P. Alicandri, V.L. Bonawit, and A.A. Johnson, "Biocompatibility of Nitinol Alloy as an Implant Material," *J. Biomed. Mater. Res.*, **10**, 695-731 (1976).

39. H. Oonishi, E. Tsuji, M. Miyaga, T. Hamada, Y. Suzuki, T. Nabeshima, T. Hamaguchi, and N. Okabe, "Biological reaction of Ni in TiNi shape memory alloy," in *2nd World Congress on Biomaterials, 10th Annual Meeting of the Society for Biomaterials*, Washington, D.C., 1984, p.183.
40. S.J. Simske and R. Sachdeva, "Cranial bone apposition and ingrowth in a porous nickel-titanium implant," *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 527-533 (1995).

Table 1. Immunogold Particles/ μm^2 Interphase Nuclei Chromatin

Group	Mean	SE	N
Negative control	94	7	8
NiTi	94	7	8
CpTi	97	6	8
SS 316L	122	8	8
Positive control	397	36	8

Table 2. Immunogold Particles/ μm^2 Metaphase Chromosomal Chromatin

Group	Mean	SE	N
Negative control	157	15	8
NiTi	157	9	8
CpTi	156	12	8
SS 316L	238	16	8
Positive control	346	13	10

FIGURE CAPTIONS

Figure 1a, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of NiTi-treated lymphocyte interphase nucleus. **b**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of cpTi-treated lymphocyte interphase nucleus. **c**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of SS 316L-treated lymphocyte interphase nucleus. **d**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of MMS-treated lymphocyte interphase nucleus. **e**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of untreated lymphocyte interphase nucleus. Original magnification X19,000.

Figure 2a, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of NiTi-treated lymphocyte metaphase chromosome. **b**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of cpTi-treated lymphocyte metaphase chromosome. **c**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of SS 316L-treated lymphocyte metaphase chromosome. **d**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of MMS-treated lymphocyte metaphase chromosome. **e**, Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of untreated lymphocyte metaphase chromosome. Original magnification X19,000.

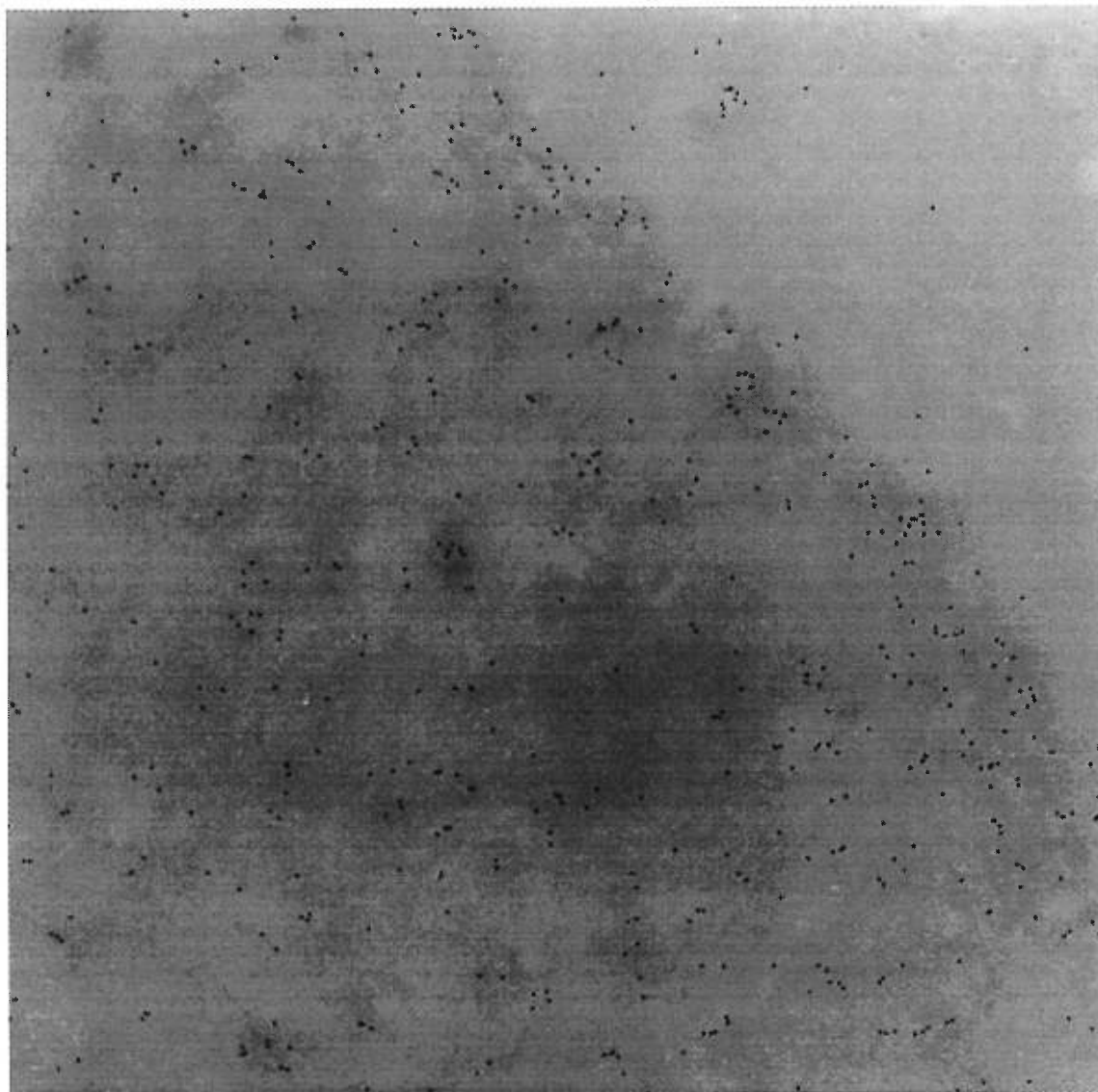


Figure 1a : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.

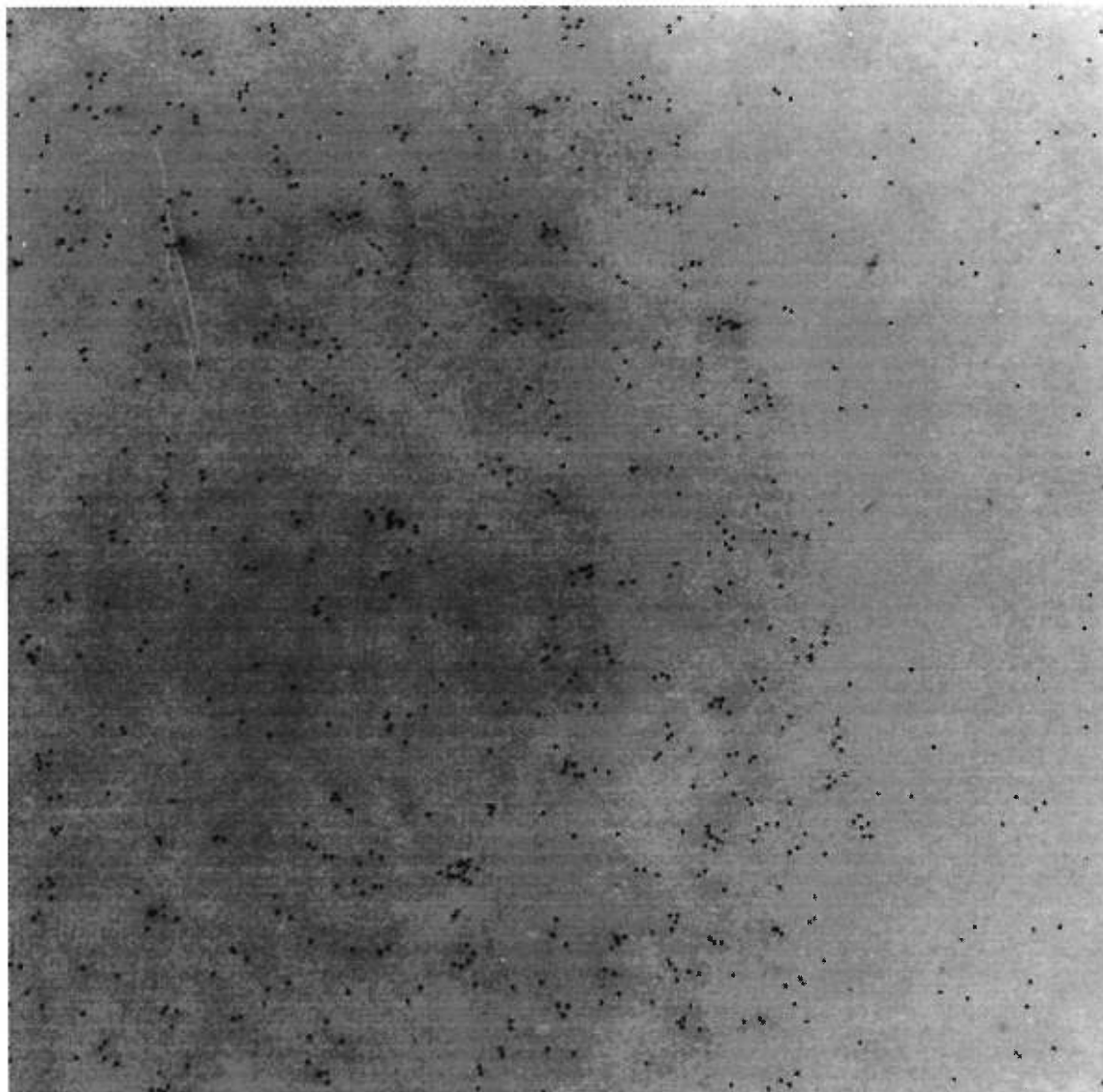


Figure 1b : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.

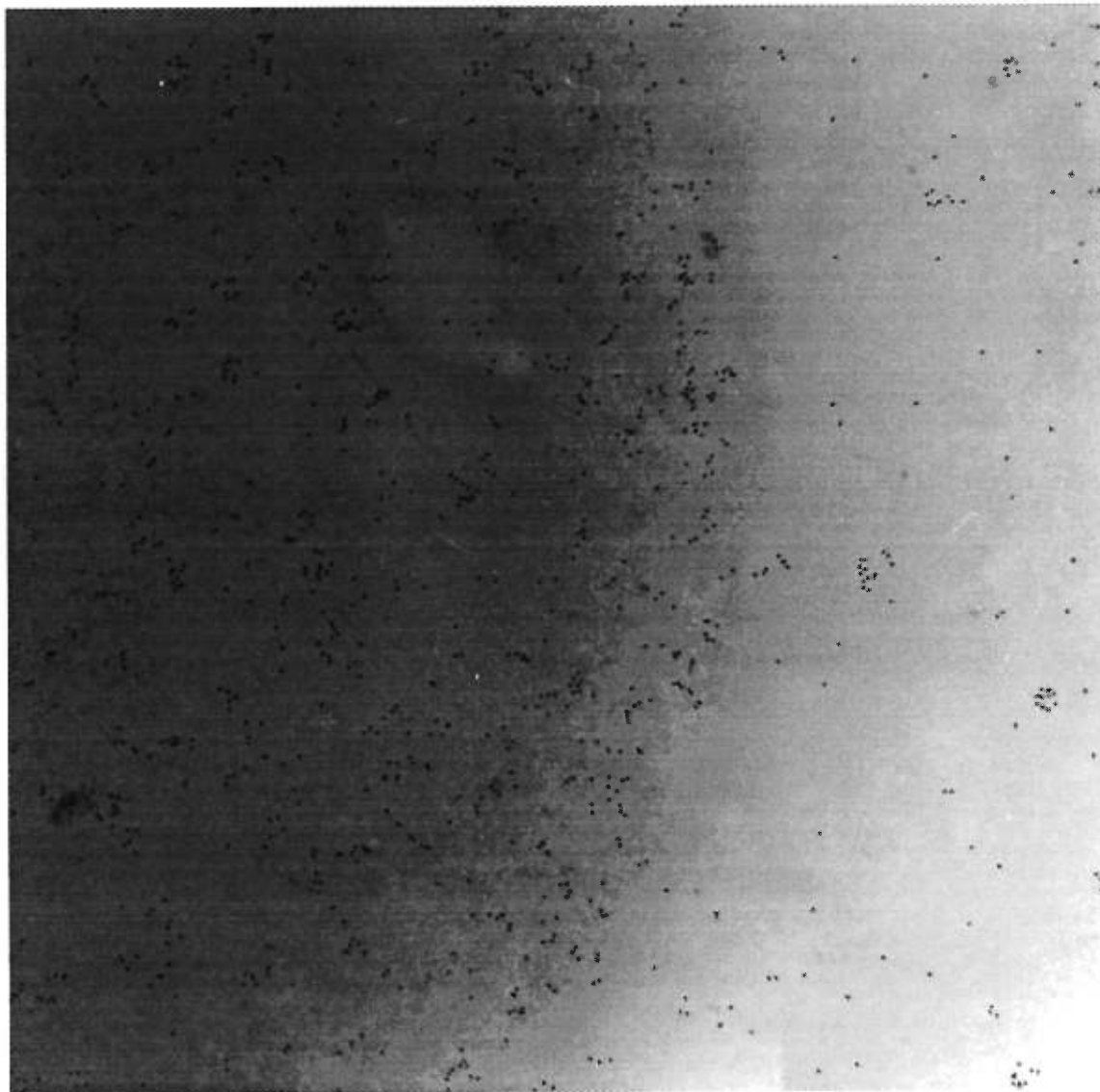


Figure 1c : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.

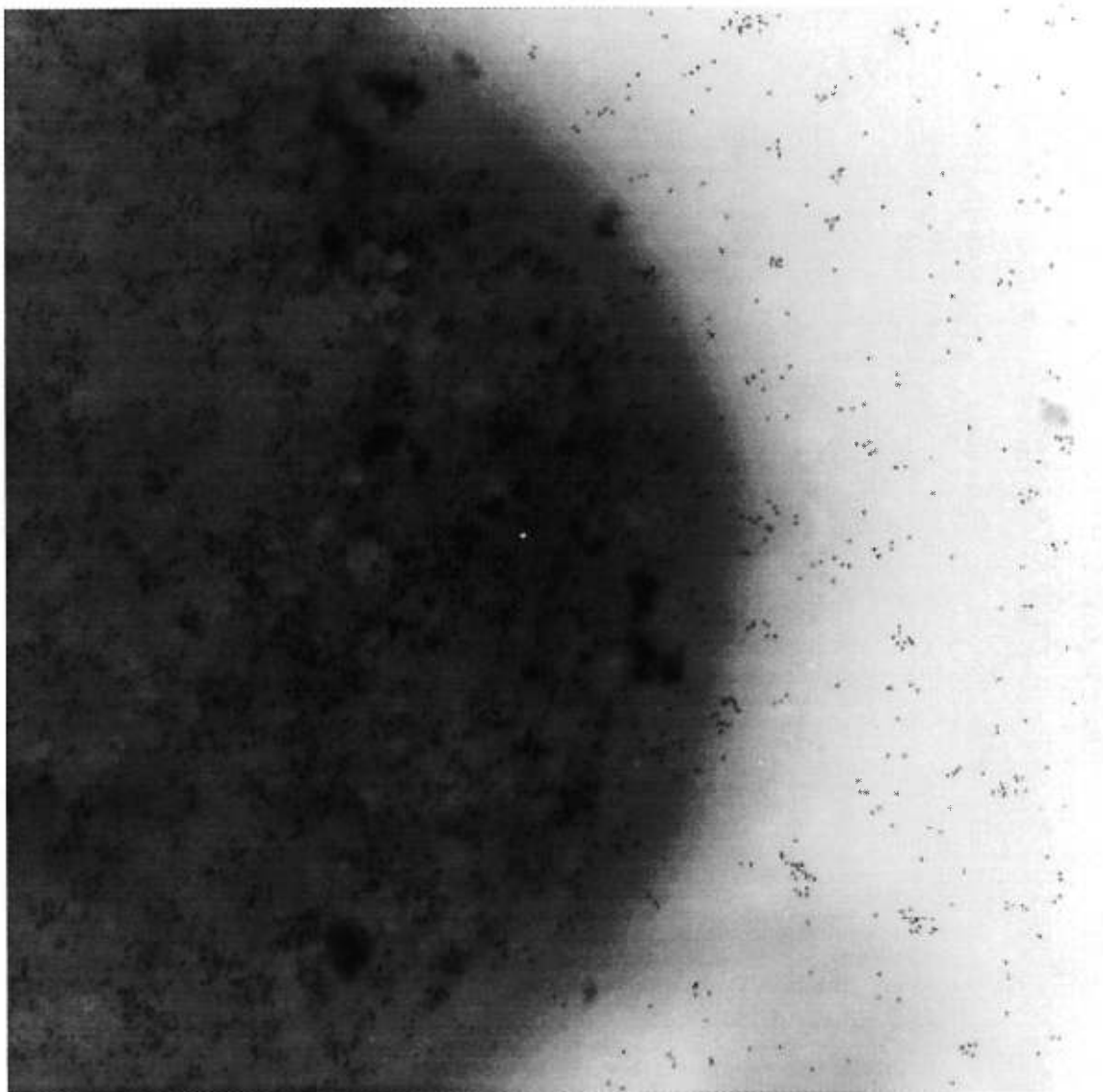


Figure 1d : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.

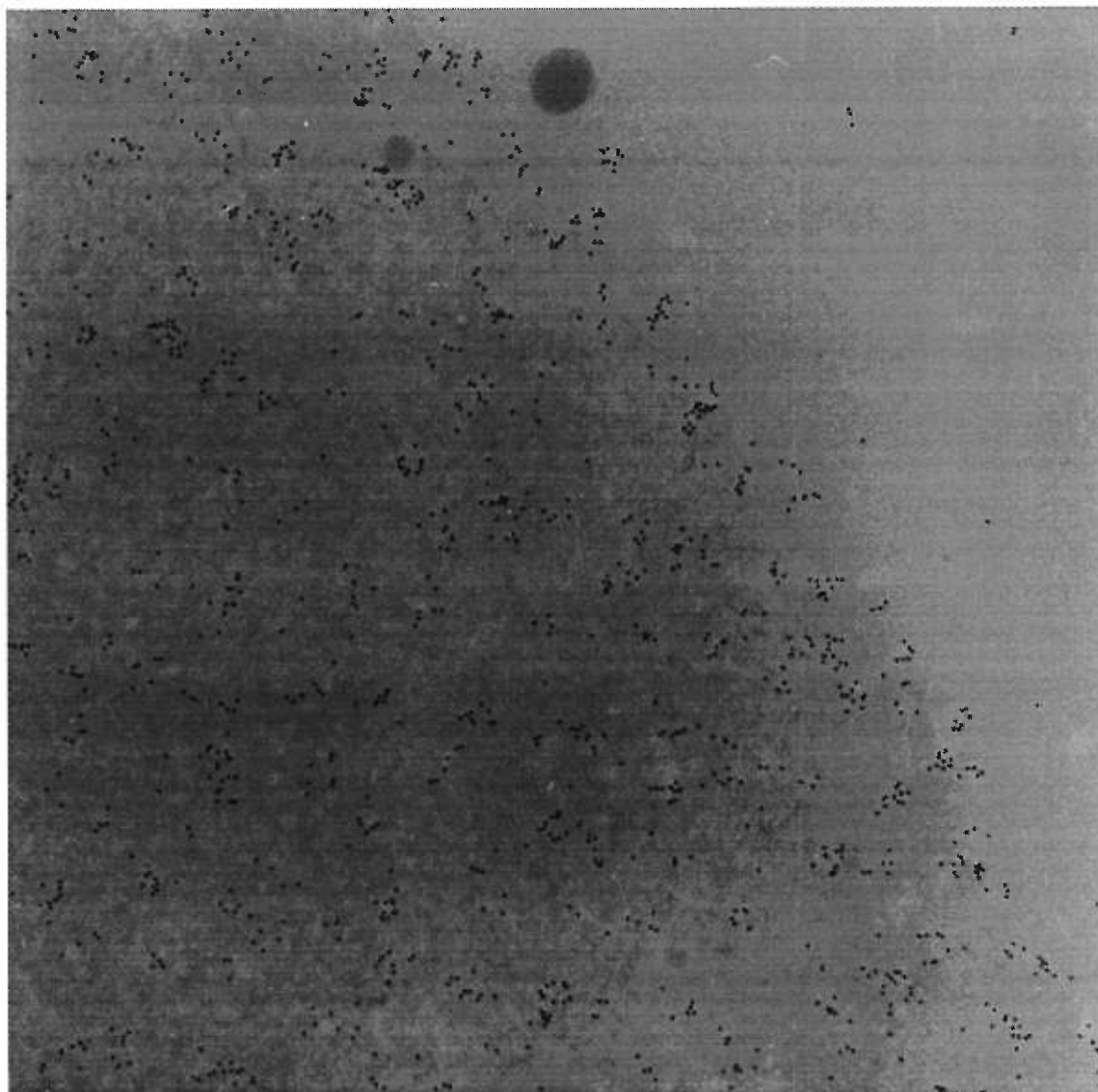


Figure 1e : Noyau interphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.

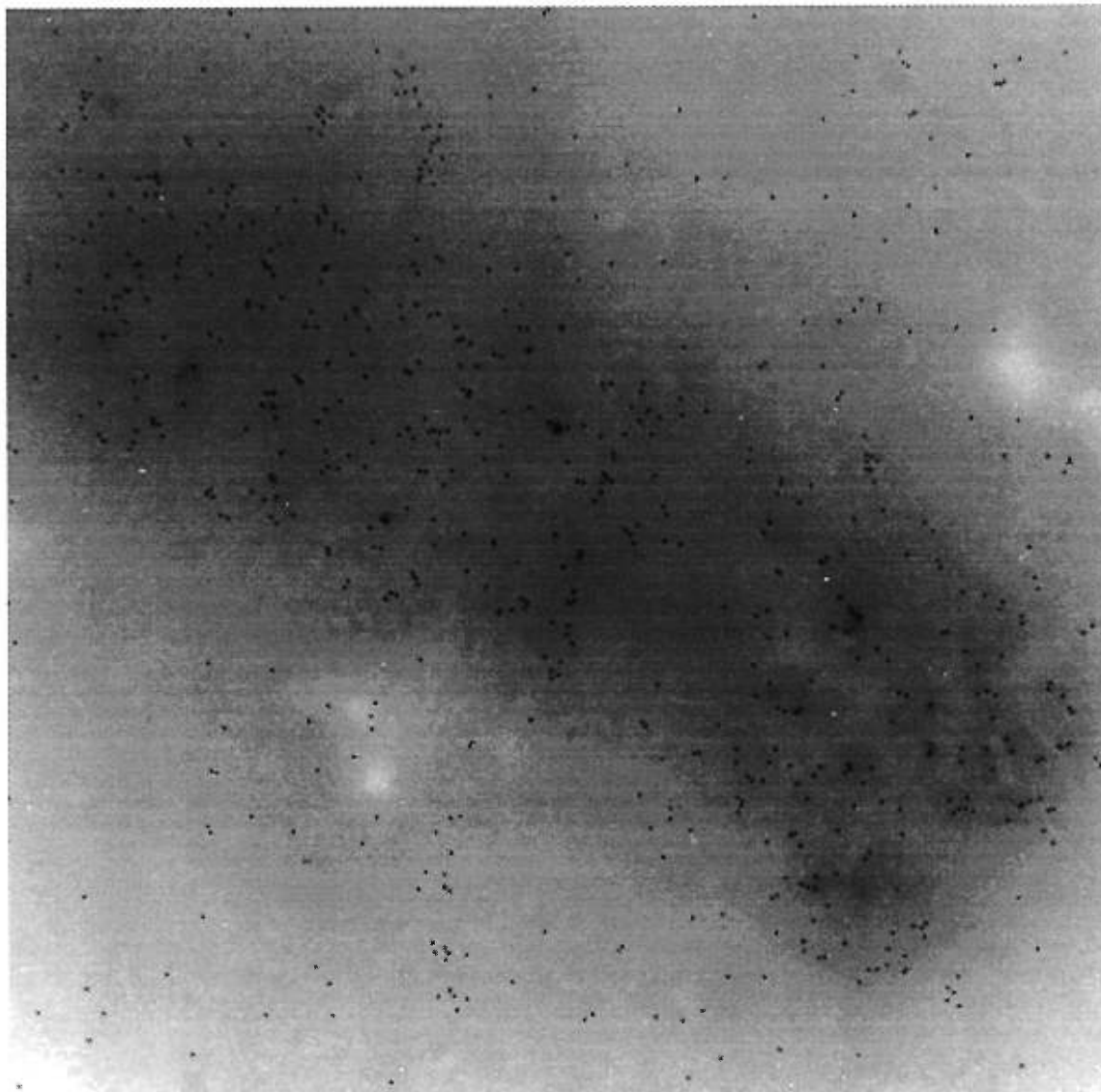


Figure 2a : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.

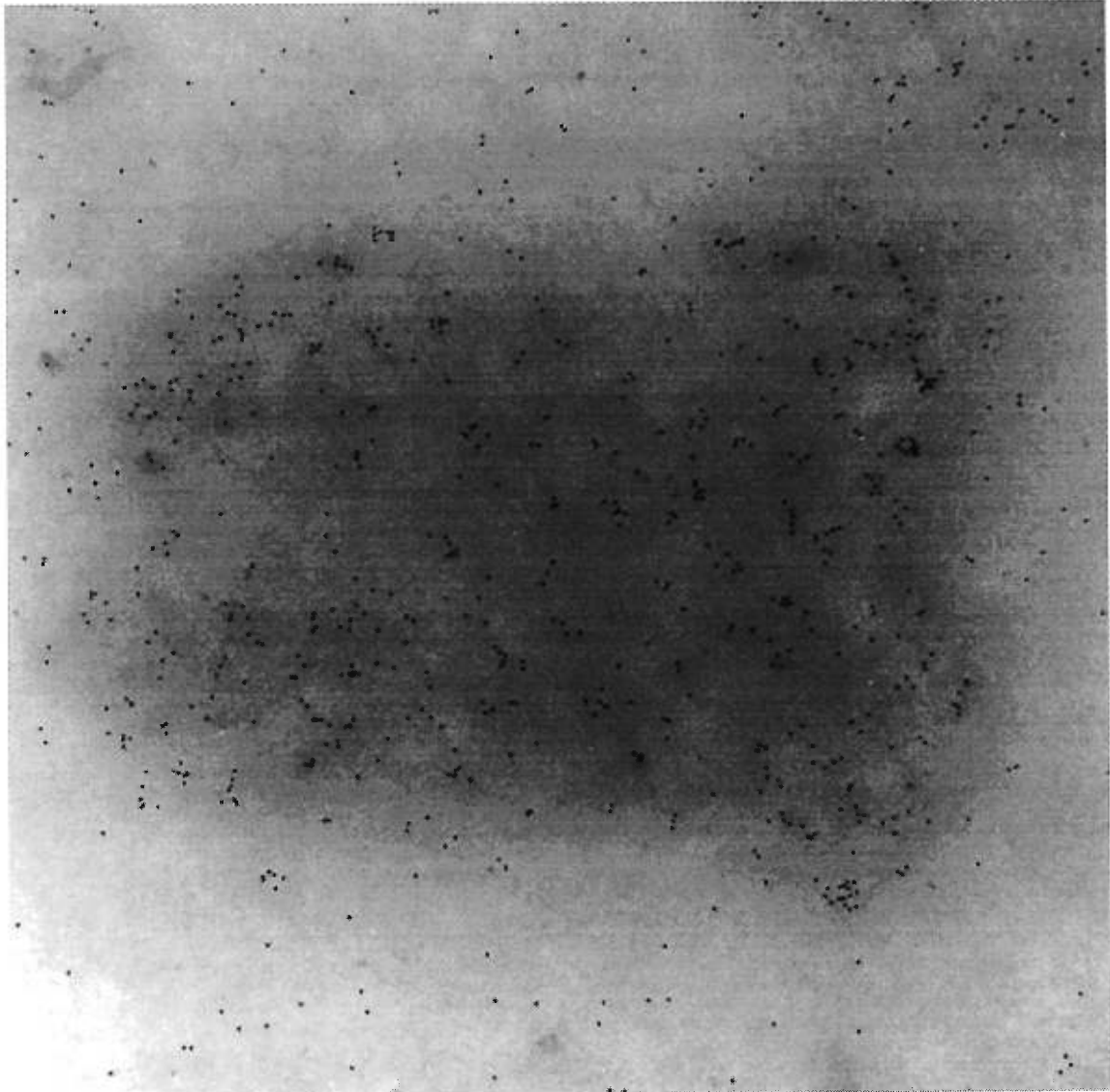


Figure 2b : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.

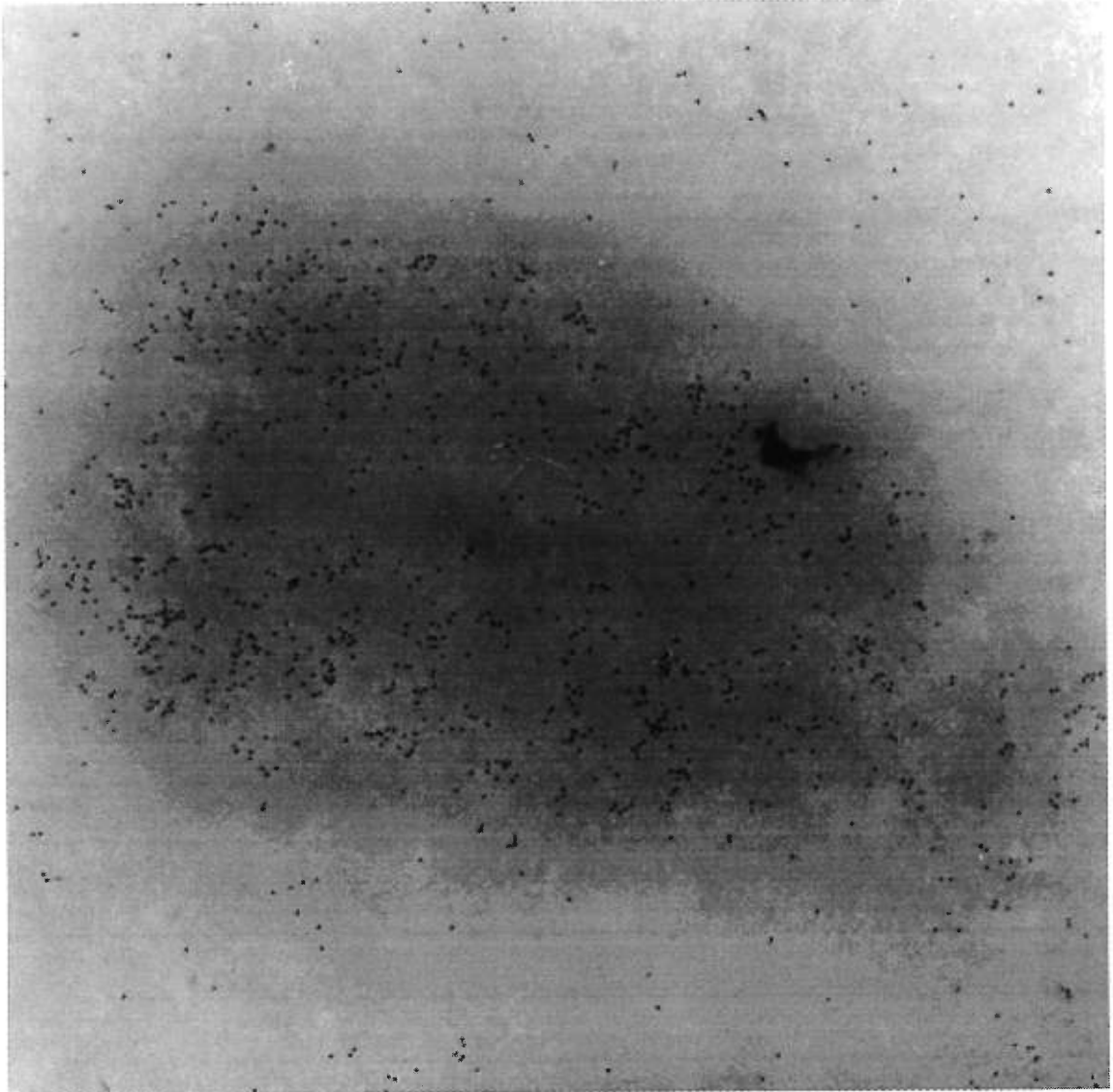


Figure 2c : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.

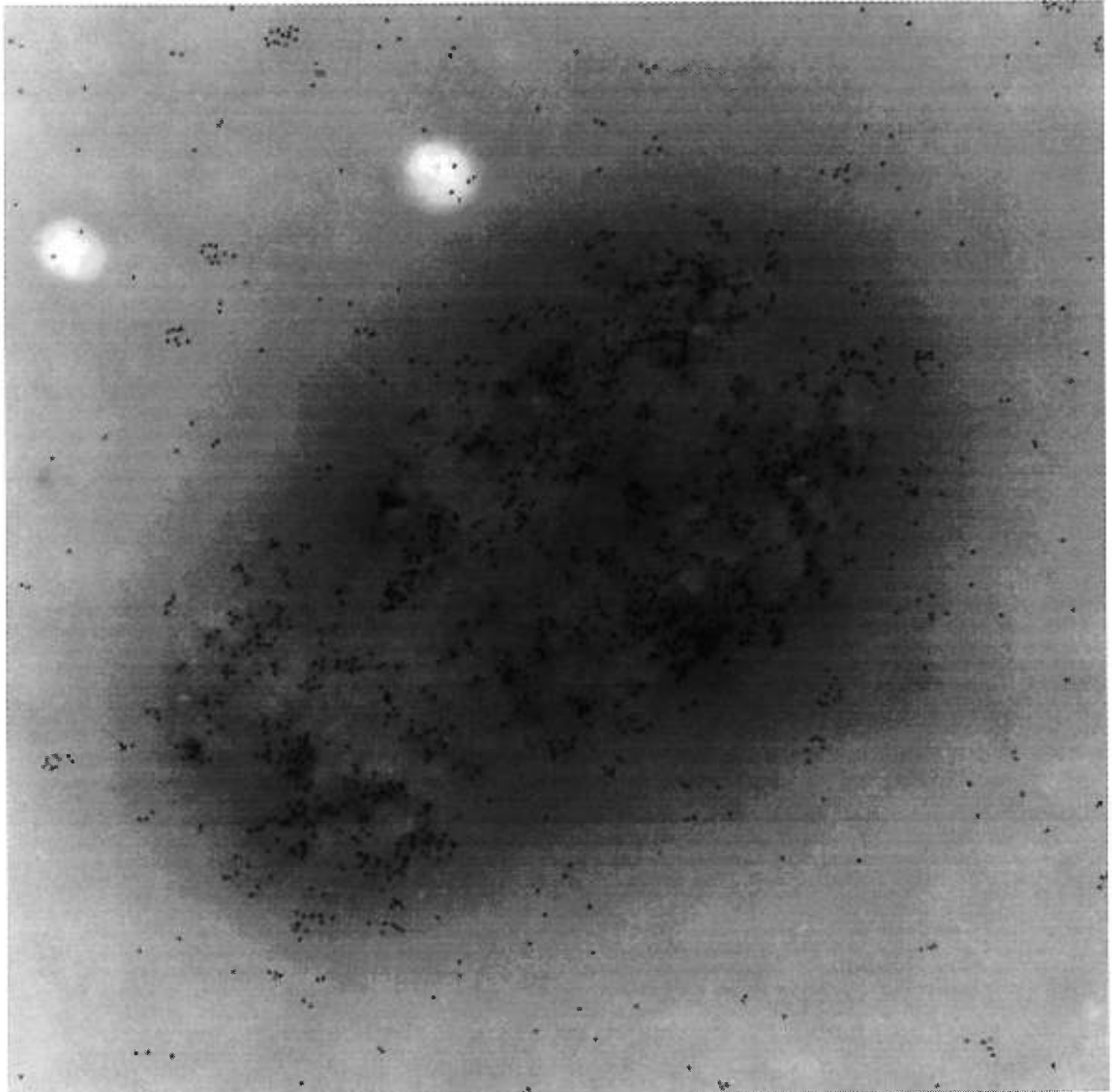


Figure 2d : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du méthyle méthanesulfonate et marqué à l'EM-ISEL.

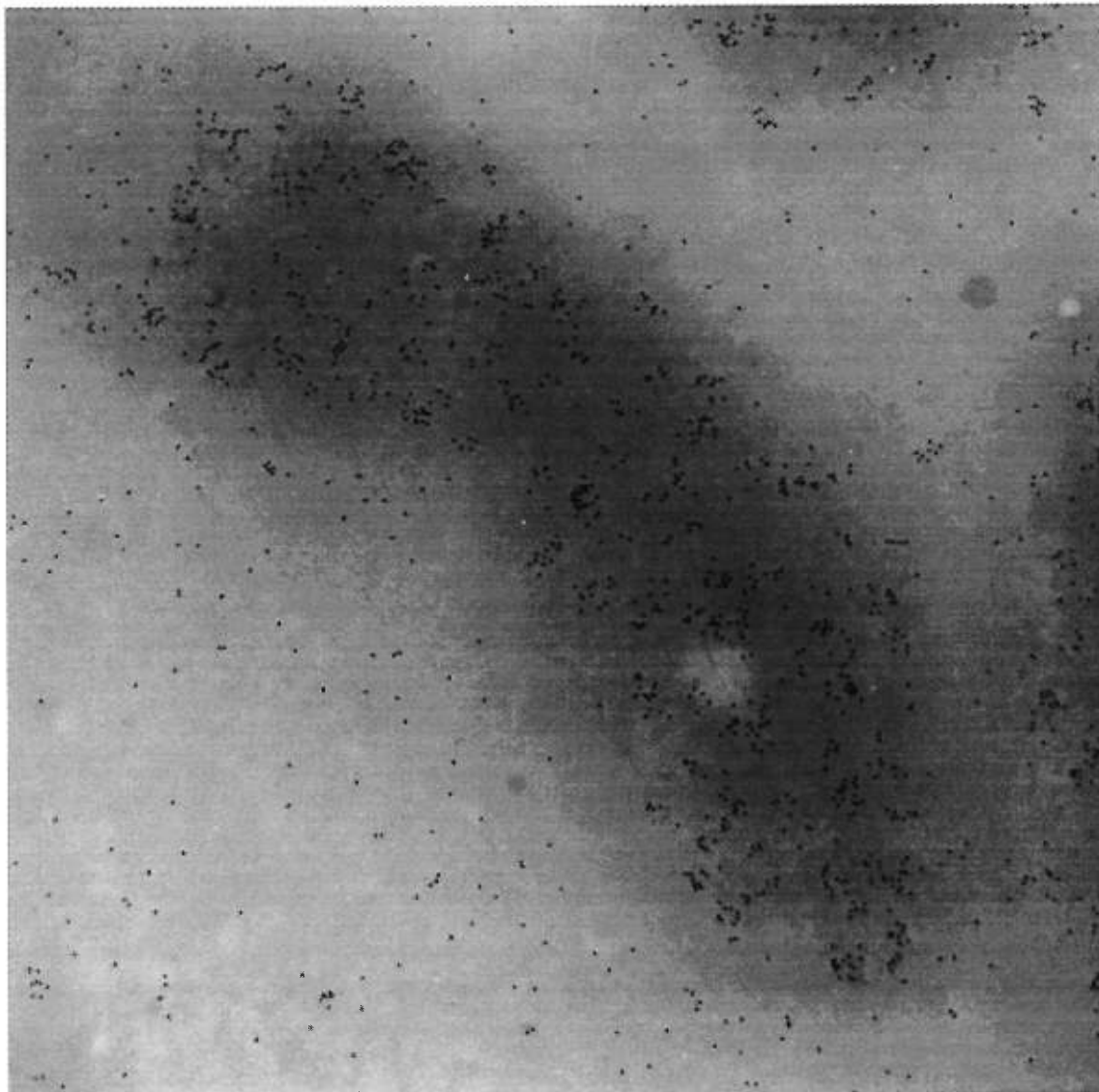


Figure 2e : Chromosome métaphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.

CHAPITRE 3

LE NICKEL-TITANE ET SES CONSTITUANTS PURS : COMPARAISON PAR L'ESSAI EM-ISEL ET L'ABSORPTION ATOMIQUE (ARTICLE 3)

“Comparative In Vitro Biocompatibility of Nickel-Titanium, Pure Nickel, Pure Titanium, and Stainless Steel: Genotoxicity and Atomic Absorption Evaluation” Assad M., Lemieux N., Rivard C.H., Yahia L'H., Bio-Medical Materials and Engineering, 9(1), pp.1-12, 1999.

L'article fut soumis à l'éditeur-en-chef le 25 novembre 1998 et il fut accepté le 20 janvier 1999.

ABSTRACT

The genotoxicity level of nickel-titanium (NiTi) was compared to that of its pure constituents, pure nickel (Ni) and pure titanium (Ti) powders, and also to 316L stainless steel (316L SS) as clinical reference material. In order to do so, a dynamic *in vitro* semiphysiological extraction was performed with all metals using agitation and ISO requirements. Peripheral blood lymphocytes were then cultured in the presence of all material extracts, and their comparative genotoxicity levels were assessed using Electron Microscopy-*In Situ* End-Labeling (EM-ISEL) coupled to immunogold staining. Cellular chromatin exposition to pure Ni and 316L SS demonstrated a significantly stronger gold binding than exposition to NiTi, pure Ti, or the untreated control. In parallel, graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (AAS) was also performed on all extraction media. The release of Ni atoms took the following decreasing distribution for the different resulting semiphysiological solutions: pure Ni, 316L SS, NiTi, Ti, and controls. Ti elements were detected after elution of pure titanium only. Both pure titanium and nickel-titanium specimens obtained a relative *in vitro* biocompatibility. Therefore, this quantitative *in vitro* study provides optimistic results for the eventual use of nickel-titanium alloys as surgical implant materials.

KEY-WORDS

nickel-titanium; biocompatibility; genotoxicity; electron microscopy; nickel release

RUNNING HEADLINE

In Vitro Biocompatibility Testing of Nickel-Titanium

INTRODUCTION

The nickel-titanium (NiTi) shape memory alloy is a candidate biomaterial for many medical applications including cardiovascular stents [1,2], veina cava filters [3], orthodontic wires [4-6], dental implants [7,8], and maxillofacial implants [9,10]. Even long-term orthopedic NiTi devices are now considered for biocompatibility evaluation [11-16]. Nickel-titanium *in vitro* biocompatibility level is however controversial. Indeed, its nickel (Ni) content justified allergic and genotoxic evaluations in the past [17,18]. To our knowledge very few studies have compared the *in vitro* cytotoxicities of NiTi alloys to both pure Ni and pure titanium (Ti) samples [19]. In this study, the genotoxicity level of NiTi was compared to the specific genotoxic reactions induced by pure Ni and pure Ti, along with 316L stainless steel (316L SS) our clinical reference control. The Electron Microscopy-*In Situ* End-Labeling (EM-ISEL) assay [20] was therefore performed in order to understand the mechanistic role of both metal elements at the ultrastructural level. Indeed, the latter assay provided quantification of *in vitro* chromatin DNA single-stranded breaks (SSBs) produced in both metaphase chromosomes and interphase nuclei using immuno-staining coupled to transmission electron microscopy. The actual quantities of Ni and Ti ions that actually leak from these materials in dynamic *in vitro* semiphysiological conditions were determined, and therefore the relative stability of these compounds was verified in parallel with cell culture testing. Metal ion diffusion and genotoxicity levels represented good indications to study molecular implications of both Ni and Ti elements in potential NiTi genotoxicity or carcinogenicity.

MATERIALS AND METHODS

Biomaterial Extraction

Following ISO 10993-12 sample preparation conditions [21], equiatomic nickel-titanium (Mémométal, France) and 316L stainless steel rods (Howmedica, New York, NY) reduced in standardized particles ($250 \mu\text{m} < \phi < 500 \mu\text{m}$), commercially pure titanium (Ti 99.0%; $150 \mu\text{m}$, max. particle size), and commercially pure nickel (Ni 99.0%; $250 \mu\text{m}$, max. particle size) powders (Goodfellow Cambridge Ltd., Berwyn, PA) were extracted (0.1g material / mL media) in RPMI-1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies, Grand Island, NY), 1% glutamine (Mediatech, Herndon, VA), 0.1% gentamicin (Schering, Montreal, Canada), and 1% phytohaemagglutinin (Murex Diagnostics, Dartford, England). Extraction was performed in polypropylene conical tubes (Sarstedt, Newton, NC) at 37°C for 24h under slow agitation using a rocker platform (Bellco Biotechnology, Vineland, NJ). Polypropylene conical tubes containing only supplemented RPMI medium without any metal specimens were processed according to the same conditions and constituted our negative controls. All resulting media were then filtered at $0.2 \mu\text{m}$.

Cell cultures

We chose peripheral blood lymphocytes because they represent well-characterized and established cell cultures for cytogenotoxicity assays as recommended by standardization bodies. They also represent cells of the immune system well known to directly respond to foreign bodies in cytocompatibility reactions [22].

Human peripheral blood was therefore obtained from a young healthy donor. Lymphocytes were prepared by incubating 0.3 mL of whole blood in 5 mL of all previous RPMI media of extraction for 72 h at 37°C as already described by Lemieux *et al.* [23]. After 70 h of incubation, most cells were arrested at metaphase using colcemid (0.1 µg / mL; Life Technologies, Grand Island, NY). Two hours later, cells were centrifuged at 2000 rpm for 10 min, resuspended in a hypotonic solution of KCl (0.075M; Sigma Chemical Co., Mississauga, Canada), and incubated at 37°C for 15 min. The cultures were then centrifuged for another 5 min, and fixed three times in absolute methanol and glacial acetic acid (3:1 v/v; Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Finally, chromosomes and nuclei spreads were prepared by letting one drop of the suspension fall onto cold and condensation-covered slides, which were then air-dried and coded for analyses.

***In Situ* End-Labeling (ISEL)**

In order to detect SSBs, the ISEL assay was performed following Assad *et al.* [18,20]. Spread chromosomes and nuclei were incubated at 37°C for 30 min with Exonuclease III (100 U). Slides were then washed with 2x SSC and PBS. Staining of chromatin was performed with a DNA labeling system kit in which dTTP had been replaced by biotin-11-dUTP. The reaction was carried out with 25 µL of the labeling mix at 37°C for 75 min, and was terminated with 0.5M EDTA. The slides were washed with 2x SSC, rinsed twice in PBS containing 0.8% human serum albumin (HSA), and then incubated with rabbit anti-biotin antibodies (RAB) for 45 min at 37°C. They were rinsed again twice in PBS 0.8% HSA, and incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibodies for 45 min at 37°C. This step was followed by another incubation with RAB

antibodies, and then with anti-rabbit IgG-colloidal gold complex of 10 nm particles. After two washes, slides were immersed in 3% glutaraldehyde at 4°C for 30 min. Chromatin was dehydrated in ethanol and dichloroethane. The slides were finally coated with 0.5% formvar dissolved in dichloroethane, and allowed to dry vertically. Chromatin was then transferred to nickel grids following Messier *et al.* [24].

Electron Microscopy

Chromosomes and nuclei mounted on nickel grids were observed using a Philips EM208 (Philips Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands) operated at 60 kV.

Immunogold counting and image analysis

Gold counts corresponding to recessed 3' hydroxyl ends were performed on a Macintosh computer using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Images of chromosomes and nuclei were scanned in the computer. The total surface of chromatin materials was evaluated at 20,000X. The number of immunogold particles (IGPs) within measured surfaces were then quantified and mean numbers of IGPs per μm^2 of chromatin were established.

Statistical analysis

One-way analyses of variance (ANOVA) were performed to determine if any statistically significant difference in gold binding existed between biomaterials (or controls) for each chromatin type. Tukey-Kramer multiple comparison tests were used as post-*hoc* analyses to determine which specific material (or control) generated a statistically different number of gold counts within interphase nuclear chromatin results,

and within metaphase chromosomal chromatin results. A two-way ANOVA was used to verify if a statistically different labeling existed between chromatin types regardless of exposition.

Metal ion analysis

The original culture media, including control standard semiphysiological solutions, were analyzed for Ti and Ni contents: corresponding conical tubes were used to determine Ni and Ti solubilization during the above semiphysiological extraction. The analyses were performed using an HGA-500 graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer, Oak Brook, IL). Characteristic wavelengths spectra for each metal element were generated in a small graphite tube. The latter was heated electrically in order to obtain thermal dissociation into free atoms (atomization), then a hollow cathode lamp provided a light beam absorbed by molecules of elements in the gaseous phase. The concentrations were then proportional to the vapor absorption. The resolutions varied between 0.5 $\mu\text{g} / \text{L}$ and 1 $\mu\text{g} / \text{L}$ for both Ni and Ti detection, except in pure nickel conditions (100 $\mu\text{g} / \text{L}$).

Reliability of metal element measurements

The analysis for all samples was performed according to Barrett *et al.* [4]. Two specimens were analyzed for each material extraction condition; the mean value was recorded.

RESULTS

A significant difference between materials for their induction of SSBs on interphase chromatin (Fig. 1) was obtained with a P value < 0.001 using a one-way

ANOVA (Table 1). A Tukey-Kramer multiple comparison test demonstrated differences in the number of immunogold particles per μm^2 of chromatin between Ni-exposed specimens (mean IGPs = 431) and other groups such as NiTi (mean IGPs = 166), pure Ti (mean IGPs = 159), and negative controls (mean IGPs = 146, Table 1). A statistically higher number of IGPs was also induced by 316L SS (mean IGPs = 429) compared to NiTi, pure Ti and negative controls (Table 1). The latter controls shared no significant differences in labeling as compared with NiTi, or pure Ti. No statistically significant differences in gold counts were observed between pure Ni and 316L SS on interphase chromatin.

Another one-way ANOVA generated significant differences between metals for their production of single-stranded breaks on metaphase chromatin (Fig. 2) with a P value < 0.001 (Table 2). According to a Tukey-Kramer multiple comparison test, 316L SS materials demonstrated a statistically higher number of IGPs (mean IGPs = 570) than all groups (Table 2): NiTi (mean IGPs = 198), pure Ti (mean IGPs = 163), pure Ni (mean IGPs = 459), and negative controls (mean IGPs = 155). However, differences in immunogold binding per μm^2 chromatin were also observed for Ni-exposed chromatin compared to NiTi, pure Ti, and negative controls (Table 2). The negative control medium has not elicited differences in labeling patterns as compared with NiTi, or pure Ti.

Regardless of material exposure and according to a two-way ANOVA, significant differences between metaphase chromosomes and interphase nuclei

chromatin staining were observed with a P value < 0.001: 309 and 266 IGPs/ μm^2 of chromatin respectively. It also revealed a significant interaction between chromatin type and metal exposure with a P value < 0.001.

After a 24-h extraction period in semiphysiological conditions, the solubilization of Ni took the following decreasing order for the different metal powders: pure Ni, 316L SS, NiTi, Ti, and controls (Table 3). Relatively speaking, the release of nickel ions from pure Ni (2600 $\mu\text{g} / \text{mL}$) exceeded that of stainless steel (87 $\mu\text{g} / \text{mL}$) by a factor of 30X, and was approximately two orders of magnitude higher than that of equiatomic NiTi (24 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Elution of titanium elements was below detection limits after atomization of pure Ni, 316L SS, and equiatomic NiTi. Pure titanium was the only material to diffuse Ti elements (51.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) during this extraction period. Neither nickel nor titanium dissolution was discerned among our negative semiphysiological controls. The high Ni leaking from pure Ni particles had a remarkably strong cytotoxicity potential: cells were mostly arrested at interphase showing signs of either apoptosis or necrosis cell death, and therefore few mitoses were harvested (results not shown).

DISCUSSION

Using peripheral blood lymphocytes we obtained very good biocompatibility results with our nickel-titanium alloy. Indeed, both titanium and nickel-titanium powders generated similar genocompatibility levels. In general, the following increasing order of relative genotoxicity was established: pure Ti, NiTi, 316L SS and pure Ni. Our results correspond very well to recent studies such as that of Shabalovskaya *et al.* [22] who have also used peripheral blood cells together with metal extracts. They have evaluated

the proliferation of mononuclear cells in the presence of Ni and Ti extracts, *versus* porous and non-porous NiTi extracts. No differences in cell responses for Ti and non-porous NiTi specimens were found; proliferation with porous NiTi was slightly lower however. They also demonstrated a very low proliferation rate with Ni extracts. Ryhanen *et al.* [25] showed satisfying results with NiTi since they have not found any statistically significant difference in muscular, neural, and perineural tissue reaction to either Nitinol, stainless steel or Ti6Al4V. A low immune cell response was seen against all three biomaterials and no qualitative differences in histology were discerned. They concluded to the clear noncytotoxicity of Nitinol, stainless steel, and Ti6Al4V. Armitage *et al.* [26] have also obtained no statistical difference between NiTi, Ti and stainless steel performance using either haemocompatibility or cytotoxicity assays.

In this study, we have harvested both nuclei (Fig. 1) and chromosomes (Fig. 2) in order to measure DNA SSBs at different times of the cell cycle: metaphase *versus* interphase stages. We observed a lower immunogold labeling in nuclei compared to chromosomes. We could postulate that the lower chromatin compaction accompanying interphasic nuclei simply offers a lower density of DNA damage per μm^2 of chromatin compared to the metaphase chromosomes. Nevertheless, regardless of chromatin type, we have found considerably higher genotoxicity values for stainless steel extracts than detected in our earlier experiments [18]. Indeed, the number of single-stranded breaks induced by 316L SS even approximate that of pure Ni for interphase chromatin specimens (Table 1); stainless steel also provoked a higher number of DNA lesions than pure Ni at the metaphase stage of the cell cycle (Table 2). That high *in vitro* genotoxicity

for 316L SS compared to NiTi and Ni specimens may be due to both Ni and Cr elements release from stainless steel enhanced this time by dynamic agitation during extraction. We also have to bear in mind that we have not evaluated the dissolution of all metal ion species present. As opposed to nickel-titanium, the surface layer of stainless steel is mainly composed of both chromium (Cr) and nickel oxides [27]. Cr and Ni species are considered genotoxic and detrimental to DNA molecules [28]: they both seem to cause DNA damage which is in turn associated with cytotoxicity, mutagenic initiation as well as promotion and progression of cancer.

In mammalian cell lines for example, Ni induces DNA strand breaks, DNA-protein cross-links [29,30] as well as chromosomal aberrations that are specifically associated to heterochromatin regions [31]. Nickel also has teratogenic effects on the basis of experiments with *Xenopus* embryos [32]. However, the specific action of nickel is still not well understood. It is known to have a comutagenic activity when combined to ultraviolet (UV) light. Indeed, the repair of photoproducts generated by UV light seems to be impaired: Ni could inhibit either the polymerization or the ligation step in excision repair [29]. Nickel inhibition of DNA strand break repair was also demonstrated after X-irradiation [33]. Ni could also intervene in the repair step after the action of reactive oxygen species, well known to have an impact on tumor formation. Recently Dally and Hartwig [31] have shown that the removal of oxidative DNA damage such as 8-hydroxyguanine (a pre-mutagenic DNA base), simply elicited by visible light, was blocked completely with only 250 μ M of Ni. Nickel could either interact directly to inactivate the repair enzyme or simply compete with ions such as magnesium, which represent essential enzymatic repair cofactors [31]. Ni²⁺ may also

directly produce oxidative DNA damage [31], and itself generate reactive species by interacting with hydrogen peroxide in order to form 8-hydroxyguanine [34].

In turn, chromium compounds have also been found to induce DNA damage such single-stranded breaks, DNA-protein cross-links and DNA-chromium adducts [35]. However, chromium action may depend on its oxidation state: it has been established that hexavalent (VI) chromium, as ion chromate, represents the primary toxic form [28]: Cr(VI) can easily pass through cell membrane and can rapidly be reduced through relatively unstable Cr(V) and Cr(IV) intermediates to kinetically stable chromium(III) [28]. Intermediate reactive oxygen species could be involved: Xu et al. [36] hypothesize that the intra-cellular reduction of Cr^{6+} to Cr^{3+} involves the production of reactive oxygen species responsible for SSBs, while Cr^{5+} or Cr^{3+} are responsible for generating DNA-protein and DNA-chromium cross-links. For example, intermediate oxidation states such as Cr(V) could be generated in concomitance with hydroxyl radicals. The latter have been known to cause breaks and the formation of 8-hydroxydeoxyguanoside [37].

In this study, spectroscopic analyses were however limited to Ni and Ti atoms. It appears that the elution of Ti elements from pure Ti powder was less important than their Ni counterparts extracted from pure nickel (Table 3), even if the mean particle sizes of Ni were higher: 250 μm vs. 150 μm , for pure nickel and pure titanium powders, respectively. A possible explanation is that nickel oxides, being less stable than titanium oxides [22,27], could be chemically more reactive with the semiphysiological medium and therefore dissolve easily. Furthermore, titanium elution was not detected with NiTi

samples (Table 3): it is well known that pure titanium and titanium alloys have the tendency to produce Ti oxide films when exposed to environmental oxygen [16,38]. According to Wever *et al.* [16] the outer surface layer of nickel-titanium alloys seems to be indeed mainly composed of TiO_2 , a very passive and chemically stable film [16-17,22,27,39] as in the case of Ti6Al4V, with minimal amount of nickel; the inner surface would be represented mostly by nickel-titanium [27]. Wever *et al.* [16] also have shown the formation of a calcium-phosphate layer on top of this titanium oxide film after immersion in Hank's physiological solution: therefore both outer layers could represent effective barriers against both Ti and Ni leaking.

Different potentiodynamic investigations have evaluated comparative passive corrosion behavior of NiTi layers. Speck and Fraker [38] established anodic polarization curves for pure Ni, 316L SS, Ti6Al4V, and NiTi: they clearly demonstrate that both 316L SS and pure Ni have the lowest breakdown potentials, both being inferior to 0.2V. In the same study, NiTi and the titanium alloy had a considerably higher breakdown potential: 1.14V and 2.0V, respectively. Wever *et al.* [16] determined a more pronounced difference between corrosion and breakdown potential for NiTi when compared to stainless steel. They concluded to a higher resistance to chemical breakdown of NiTi passivity compared to that of stainless steel; the latter seem to involve a larger number of metal ions and electrons in the formation process of its Cr_2O_3 passive film [40], and may not be as resistant. Ti6Al4V materials showed a passive behavior over the entire potential range without pitting [16]. Randin *et al.* [41] also found that, in artificial sweat, pitting potential for Ti is the highest (>3.0V) compared with NiTi (0.6-1.05V) and 316L SS (0.53V). Under clinical conditions, however, Edie *et*

al. [42] did not find any significant difference between stainless steel and NiTi orthodontic wire corrosion retrieved after a clinical service of one to eight months: no pits or surfaces typical of anodically dissolved wires were observed in either case.

This general good NiTi corrosion behavior may be explained via the concept of intermetallics. Indeed, Ni and Ti in equiatomic concentrations form an intermetallic state compound. In metallurgy terms, this intermetallic NiTi phase when equiatomic is characterized by a well-stable and -ordered state of type B2, as opposed to 316L SS [43]. The latter material, being composed of different metallic elements including chromium and nickel, is a solid solution in which the alloying elements occupy the positions of the Fe atoms in an fcc lattice. With the type of stability found in equiatomic NiTi, which tends to keep this order, we would need to add further energy to be able to replace or solubilize the Ni atoms as it is stated by thermodynamic laws. NiTi is therefore considered stable in metallurgic terms and nickel ions are not easily replaced or dissolved, otherwise we would obtain different types of intermetallics [43]. This type of stability conferred by this intermetallic structure is not seen in stainless steel. The latter may thus provide more easily soluble forms of metal ions in these dynamic semiphysiological conditions.

This intermetallic structure and stability obtained with the NiTi alloy may also explain why we were able to detect nickel traces even after atomization of 99% pure Ti powders: the remaining 1% may have provided easily soluble forms of Ni ions. Although the content of Ni is low when in the presence of 99% pure Ti, the concentration of Ni elements it releases after 24h is even comparable to the one that is

diffused by the equiatomic NiTi alloy itself. In the case of pure nickel powder, elution of nickel atoms averaged about 25 times that of stainless steel and was two orders of magnitudes higher than that of NiTi. We therefore observe that when Ni and Ti are alloyed equiatomic, they behave better than stainless steel which leaks >3X more Ni particles than the NiTi alloy. In appearance, those results may seem in contradiction with those from Ryhanen *et al.* [27] who have discerned a higher dissolution of Ni from Nitinol than from 316L SS after two days; however their release rate was measured in presence of cells, one compromise we were not able to make during agitation.

We have chosen to specifically verify the action of both nickel and titanium dissolved ions rather than dense materials, therefore our semiphysiological solutions were filtered after metal extraction. Indeed, it has been hypothesized that the direct contact of particles may cause physical cell damage *in vitro* [44,45]. One disadvantage in using metal powders is that few methods can be applied to treat them either mechanically or electrochemically before genotoxicity or cytotoxicity assays. Nevertheless, it will be interesting to continue developing methods that improve NiTi biocompatibility. In fact, Vichev *et al.* [46] have already been working on how to increase the protective Ti oxide barrier at the NiTi surface using different thermally grown oxide films. Laser treatments [14] have also been developed to selectively increase the titanium oxide layer while diminishing superficial Ni concentration. Others have tried to work on surface treatments such as electrochemical polishing [27]. Also, arc ion plating coating of a titanium nitride film [47], and deposition of a plasma polymerized thin film of tetrafluoroethylene [13,48] also represent alternative methods to protect NiTi surface.

CONCLUSION

We have quantified the relative genotoxicity of pure Ni, pure Ti, NiTi, and stainless steel in dynamic semiphysiological *in vitro* conditions. Cellular chromatin exposed to pure Ni extracts demonstrated a significantly stronger immunogold labeling than when exposed to NiTi, pure Ti, or the untreated control. 316L SS specimens also appeared more genotoxic than NiTi, pure Ti and untreated control in these *in vitro* conditions. Compared to 316L SS, NiTi seemed to obtain a very good genocompatibility: we postulate that it is probably the Ti oxide layer at the NiTi outer surface that protects against Ni ion dissolution. Another factor of importance is that stainless steel does not only contain nickel but also other metal elements such as chromium: both are well known for their carcinogenic potential. We also have evaluated the dissolution of Ni and Ti particles, respectively. In general, nickel seems to dissolve more easily than titanium: it could be the result of the unstability of nickel and nickel oxides. The release of Ni elements took the following decreasing distribution for the different powders extracted: pure Ni, 316L SS, NiTi, and pure Ti. The structure and stability of nickel-titanium, its correspondent corrosion level, taken together with the action of its metals species in these *in vitro* conditions, represent very promising results for NiTi biocompatibility approbation. Nevertheless, surface treatments in order to further decrease bulk Ni ions elution represent interesting future investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Pathology Department (*Hôpital Ste-Justine*) for utilization of their EM facilities. We also wish to thank S. Rhalmi, A. Bilodeau, and F. Fortin for their competent technical assistance, and J. Léveillé for his excellent

photographic work. We acknowledge Professor J. Van Humbeeck (Metallurgy and Materials Engineering Department, *Katholieke Universiteit Leuven*, Belgium) for his precious private communication. We also wish thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and *Recherche et Diagnostic en Cytogénétique* (REDICY Inc.) for financial support.

REFERENCES

- [1] C. Trépanier, T.K. Leung, M. Tabrizian, L'H. Yahia, J.G. Bienvenu, J.F. Tanguay, D.L. Piron, and L. Bilodeau, In vivo biocompatibility study of NiTi stents, in: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1997, pp.423-428.
- [2] R.T. Chang, T.H. Campbell, and M.O. Bloem, Intracoronary Ni-Ti stent implantation in the porcine animal model, in: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1997, pp.579-584.
- [3] M. Simon, R. Kaplow, E. Salzman, and D. Freiman, A vena cava filter using thermal shape memory alloy: Experimental aspects, *Radiology* **125**(1) (1977), 87-94.
- [4] R.D. Barrett, S.E. Bishara, and J.K. Quinn, Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro, *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **103**(1) (1993), 8-14.

[5] H. Hempowitz, F.G. Sander, A. Wichelhaus, R.P. Franke, and J. Edrich, Nonlinear finite element calculations of orthodontic archwires made of superelastic NiTi-alloys, in: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1997, pp.491-496.

[6] H. Hempowitz, F.G. Sander, A. Wichelhaus, R.P. Franke, and J. Edrich, Heat treatment of NiTi-archwires, simulated with nonlinear coupled finite element analysis, in: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1997, pp.497-501.

[7] A.A. Levenets, M.A. Zvigintsev, S.I. Starosvetsky, V.M. Semenyuk, A.I. Pozdeev, and V.E. Gjunter, Dental implantation of perspicacious NiTi endoprosthesis in diabetes mellitus, in: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montreal, Canada, 1997, p. 179.

[8] M.Z. Mirgazizov, R.G. Hafizov, G.T. Saleeva, R.A. Saleev, and A.M. Mirgazizov, Dental mechanoactive implants with the effect shape memory, in: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montreal, Canada, 1997, p.182.

- [9] A.A. Ilyin, P.G. Sysolyatin, V.E. Gunter, A.P. Dergilev, M.A. Didin, S.P. Sysolyatin, and I.A. Makarova, The use of superelastic shape memory implants in temporomandibular joint surgery, in: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montreal, Canada, 1997, p.177.
- [10] I.D. Tazin, The usage of superelastic shape memory implants in maxillofacial surgery, in: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montreal, Canada, 1997, p.186.
- [11] P.P.F. Kuo, P.J. Yang, Y.F. Zhang, H.B. Yang, Y.F. Yu, K.R. Dai, W.Q. Hong, M.Z. Ke, T.D. Cai, and J.C. Tao, The Use of Nickel-Titanium Alloy in Orthopedic Surgery in China, *Orthopedics* **12**(1) (1989), 111-116.
- [12] J.O. Sanders, A.E. Sanders, R. More, and R.B. Ashman, A Preliminary Investigation of Shape Memory Alloys in the Surgical Correction of Scoliosis, *Spine* **18**(12) (1993), 1640-1646.
- [13] F. Villermaux, M. Tabrizian, L'H. Yahia, G. Czeremutskin, and D. Piron, Corrosion resistance improvement of NiTi Osteosynthesis Staples by Plasma Polymerized Tetrafluoroethylene Coating, *Biomed. Mater. Eng.* **6**(4) (1996), 241-254.
- [14] F. Villermaux, M. Tabrizian, S. Rhalmi, C.H. Rivard, M. Meunier, G. Czeremutskin, D.L. Piron, and L'H. Yahia, Cytocompatibility of NiTi shape memory alloy biomaterials, in: *Proceedings of the Second International Conference on Shape*

Memory and Superelastic Technologies, A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1997, pp.417-422.

[15] P.A. Savchenko, V.A. Lazarev, I.V. Sokulov, V.E. Gjunter, and A.V. Proskurin, Correction of scoliotic deformities of the vertebral column with superelastic designs, in: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montreal, Canada, 1997, p.163.

[16] D.J. Wever, A.G. Veldhuizen, J. de Vries, H.J. Busscher, D.R.A. Uges, and J.R. van Horn, Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy, *Biomaterials* **19**(7-9) (1998), 761-769.

[17] D.J. Wever, A.G. Veldhuizen, M.M. Sanders, J.M. Schakenraad, and J.R. van Horn, Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy, *Biomaterials* **18**(16) (1997), 1115-1119.

[18] M. Assad, L'H. Yahia, C.H. Rivard, and N. Lemieux, *In Vitro* Biocompatibility Assessment of a Nickel-Titanium Alloy using Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL), *J. Biomed. Mater. Res.* **41**(1) (1998), 154-161.

[19] J.L.M. Puffers, D.M.K.S. Kaulesar Sukul, G.R. de Zeeuw, A. Bijma, and P.A. Besselink, Comparative Cell Culture Effects of Shape Memory Metal (Nitinol[®]), Nickel and Titanium: A Biocompatibility Estimation, *Eur. Surg. Res.* **24**(6) (1992), 378-382.

[20] M. Assad, N. Lemieux, and C.H. Rivard, Immunogold electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL): Assay for biomaterial DNA damage detection, *Biomed. Mater. Eng.* **7**(6) (1997), 391-400.

[21] International Organization for Standardization, Biological evaluation of medical devices, International Standard #10993-12, Sample preparation and reference materials, ISO, Geneva, Switzerland, 1996, pp.1-11.

[22] S. Shabalovskaya, J. Anderegg, and J. Cunnick, X – ray spectroscopic and *in vitro* study of porous TiNi, in: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1997, pp.401-406.

[23] N. Lemieux, R. Drouin, and C.L. Richer, High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study, *Hum. Genet.* **85**(3) (1990), 261-266.

[24] P.E. Messier, P. Jean, and C.L. Richer, Easy transfer of selected mitoses from light to electron microscopy, *Cytogenet. Cell Genet.* **43**(3-4) (1986), 207-210.

[25] J. Ryhanen, M. Kallioinen, J. Tuukkanen, J. Junila, E. Niemela, P. Sandvik, and W. Serlo, *In vivo* biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy: Muscle and perineural tissue responses and capsule membrane thickness, *J. Biomed. Mater. Res.* **41**(3) (1998), 481-488.

- [26] D.A. Armitage, D.M. Grant, T.L. Parker, and K.G. Parker, Haemocompatibility of surface modified NiTi, in: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1997, pp.401-406.
- [27] J. Ryhanen, E. Niemi, W. Serlo, E. Niemela, P. Sandvik, H. Pernu, and T. Salo, Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures, *J. Biomed. Mater. Res.* **35**(4) (1997), 451-457.
- [28] E.T. Snow, Metal Carcinogenesis: Mechanistic Implications, *Pharmacol. Ther.* **53**(1) (1992), 31-65.
- [29] A. Hartwig, I. Kruger, and D. Beyersmann, Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair, *Toxicol. Lett.* **72**(1-3) (1994), 353-358.
- [30] S.R. Patierno, M. Sugiyama, J.P. Babilion, and M. Costa, Preferential DNA-protein crosslinking by NiCl₂ in magnesium-insoluble regions of fractionated Chinese hamster ovary cell chromatin, *Cancer Res.* **45**(11 Pt 2) (1985), 5787-5794.
- [31] H. Dally and A. Hartwig, Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells, *Carcinogenesis* **18**(5) (1997), 1021-1026.

- [32] F.W. Sunderman, Search for molecular mechanisms in the genotoxicity of nickel, *Scand. J. Work Environ. Health* **19**(suppl.1) (1993), 75-80.
- [33] N.T. Christie, The synergistic interaction of nickel(II) with DNA damaging agents, *Toxicol. Environ. Chem.* **22** (1989), 51-59.
- [34] Y.C. Hong, S.R. Paik, H.J. Lee, K.H. Lee, and S.M. Jang, Magnesium inhibits nickel-induced genotoxicity and formation of reactive oxygen, *Environ. Health Perspect.* **105**(7) (1997), 744-748.
- [35] F.C.R. Manning, J. Xu, and S.R. Patierno, Transcriptional Inhibition by Carcinogenic Chromate: Relationship to DNA Damage, *Mol. Carcinog.* **6**(4) (1992), 270-279.
- [36] J. Xu, J.P. Wise, and S.T. Patierno, DNA damage induced by carcinogenic lead chromate particles in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.* **280**(2) (1992), 129-136.
- [37] M. Sugiyama, K. Tsuzuki, and N. Haramaki, DNA single-stranded breaks and cytotoxicity induced by sodium chromate(VI) in hydrogen peroxide-resistant cell lines, *Mutat. Res.* **299**(2) (1993), 95-102.
- [38] K.M. Speck and A.C. Fraker, Anodic Polarization Behavior of Ti-Ni and Ti-6Al-4V in Simulated Physiological Solutions, *J. Dent. Res.* **59**(10) (1980), 1590-1595.

- [39] Y. Oshida and S. Miyazaki, Corrosion and biocompatibility of shape memory alloys, *Corrosion Eng.* **40** (1991), 1009-1025.
- [40] R.S. Dutta, K. Madangopal, H.S. Gadiyar, and S. Banerjee, Biocompatibility of a Ni-Ti shape memory alloy, *British Corrosion Journal* **28**(3) (1993), 217-221.
- [41] J.P. Randin, Corrosion behavior of nickel-containing alloys in artificial sweat, *J. Biomed. Mater. Res.* **22**(7) (1988), 649-666.
- [42] J.W. Edie, G.F. Andreason, and M.P. Zaytoun, Surface Corrosion of Nitinol and Stainless Steel Under Clinical Conditions, *Angle Orthod.* **51**(4) (1981), 319-324.
- [43] J. Van Humbeeck, private communication, (1998).
- [44] E.J. Evans, Cell damage *in vitro* following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy, *Biomaterials* **15**(9) (1994), 713-717.
- [45] M. Assad, E.A. DesRosiers, L'H. Yahia, and C.H. Rivard, Cytocompatibility testing of the Shape-Memory Nickel-Titanium (NiTi) Alloy, in: *Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Society for Biomaterials in Conjunction with the 26th International Biomaterials Symposium*, Boston, Massachusetts, 1994, p.297.

[46] R.G. Vichev, Y. Liu, J. Van Humbeeck, B. Blanpain, and J.P. Celis, Thermally grown oxide films on NiTi Shape Memory Alloys, in: *Proceedings of the 7th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis (ECASIA 97)*, I. Olefjord, L. Nyborg, and D. Briggs, eds, Goteborg, Sweden, 1997, pp.679-682.

[47] K. Endo, R. Sachdeva, Y. Araki, and H. Ohno, Effects of Titanium Nitride Coatings on Surface and Corrosion Characteristics of Ni-Ti Alloy, *Dent. Mater. J.* **13**(2) (1994), 228-239.

[48] S. Lombardi, L'H. Yahia, J.E. Klemberg-Sapieha, D.L. Piron, A. Selmani, C.H. Rivard, and G. Drouin, Improvement in Corrosion Resistance of Ni-Ti Shape Memory Alloy by Plasma Surface Modification, in: *Proceedings of the First Shape Memory and Superelastic Technologies*, A. Pelton, D. Hodgson, and T. Duerig, eds, Monterey, California, 1995, pp.221-226.

Table 1. Immunogold particles/ μm^2 interphase nucleus chromatin

Group	Mean	SD	SE	N
Negative control	145.5	18	6	10
Ti	159.1	17	5	10
NiTi	166.1	24	7	10
316L SS	429.3*	49	15	10
Ni	430.7*	67	21	10

*Statistically different from negative control, Ti, and NiTi ($p < 0.001$, ANOVA).

Table 2. Immunogold particles/ μm^2 metaphase chromosomal chromatin

Group	Mean	SD	SE	N
Negative control	155.2	19	6	10
Ti	163.4	26	8	10
NiTi	198.1	36	11	10
316L SS	570.0*	28	9	10
Ni	459.0**	110	35	10

*Statistically different from negative control, Ti, NiTi, and Ni ($p < 0.001$, ANOVA).

**Statistically different from negative control, Ti, NiTi and 316L SS ($p < 0.001$, ANOVA).

Table 3. Average release of metal ions after 24h in semiphysiological medium
($\mu\text{g} / \text{L}$)

Group	Ni	Ti
Negative control	<0.6	<0.5
Ti	20.5	51.5
NiTi	23.7	<1.0
316L SS	86.7	<1.0
Ni	2600	<0.5

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of lymphocyte interphase nuclei: (a) NiTi-treated, (b) pure Ti-treated, (c) 316L SS-treated, (d) pure Ni-treated, (e) untreated; Original magnification 20,000x.

Figure 2. Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling of lymphocyte metaphase chromosomes: (a) NiTi-treated, (b) pure Ti-treated, (c) 316L SS-treated, (d) pure Ni-treated, (e) untreated; Original magnification 20,000x.

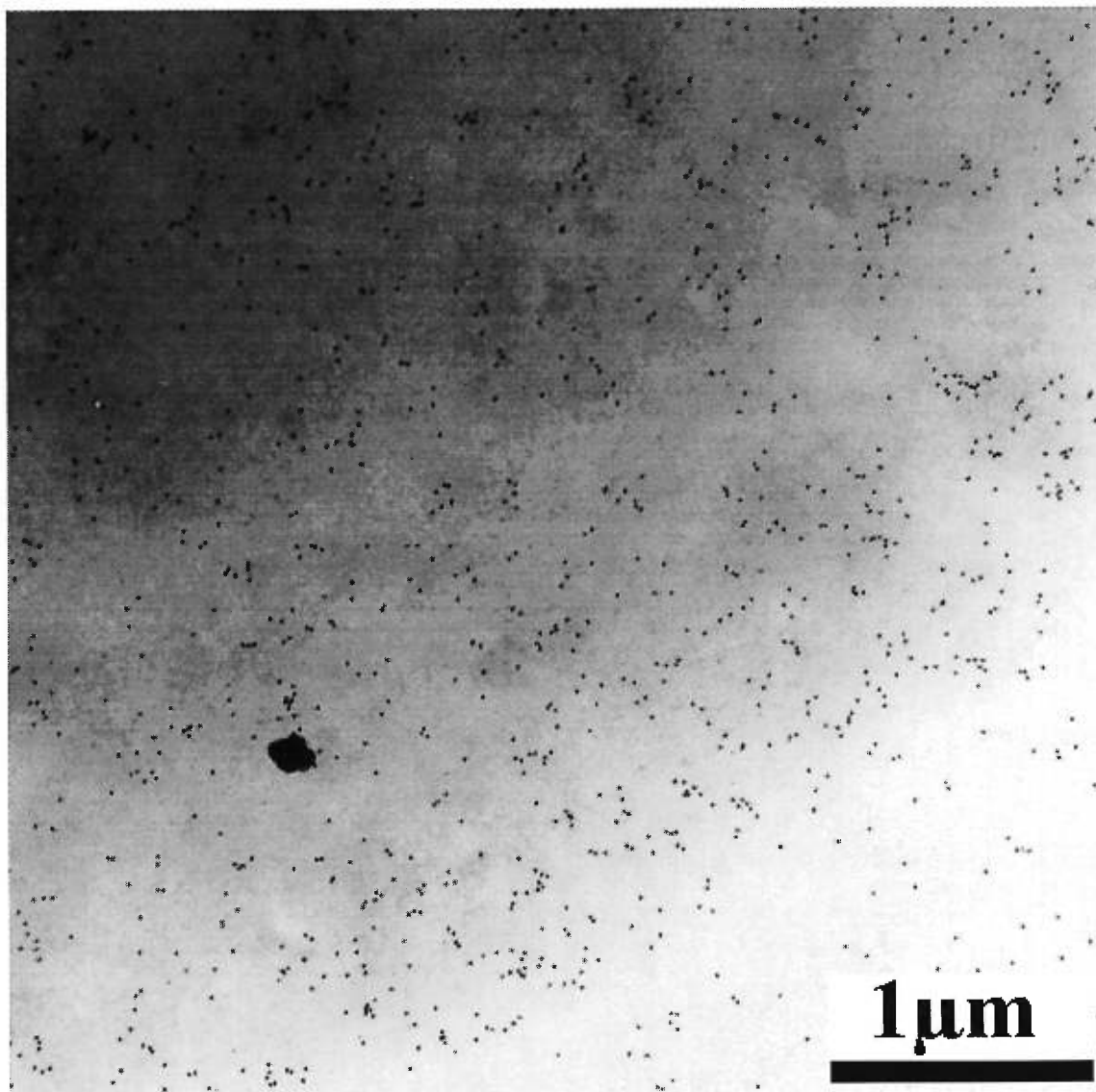


Figure 1a : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.

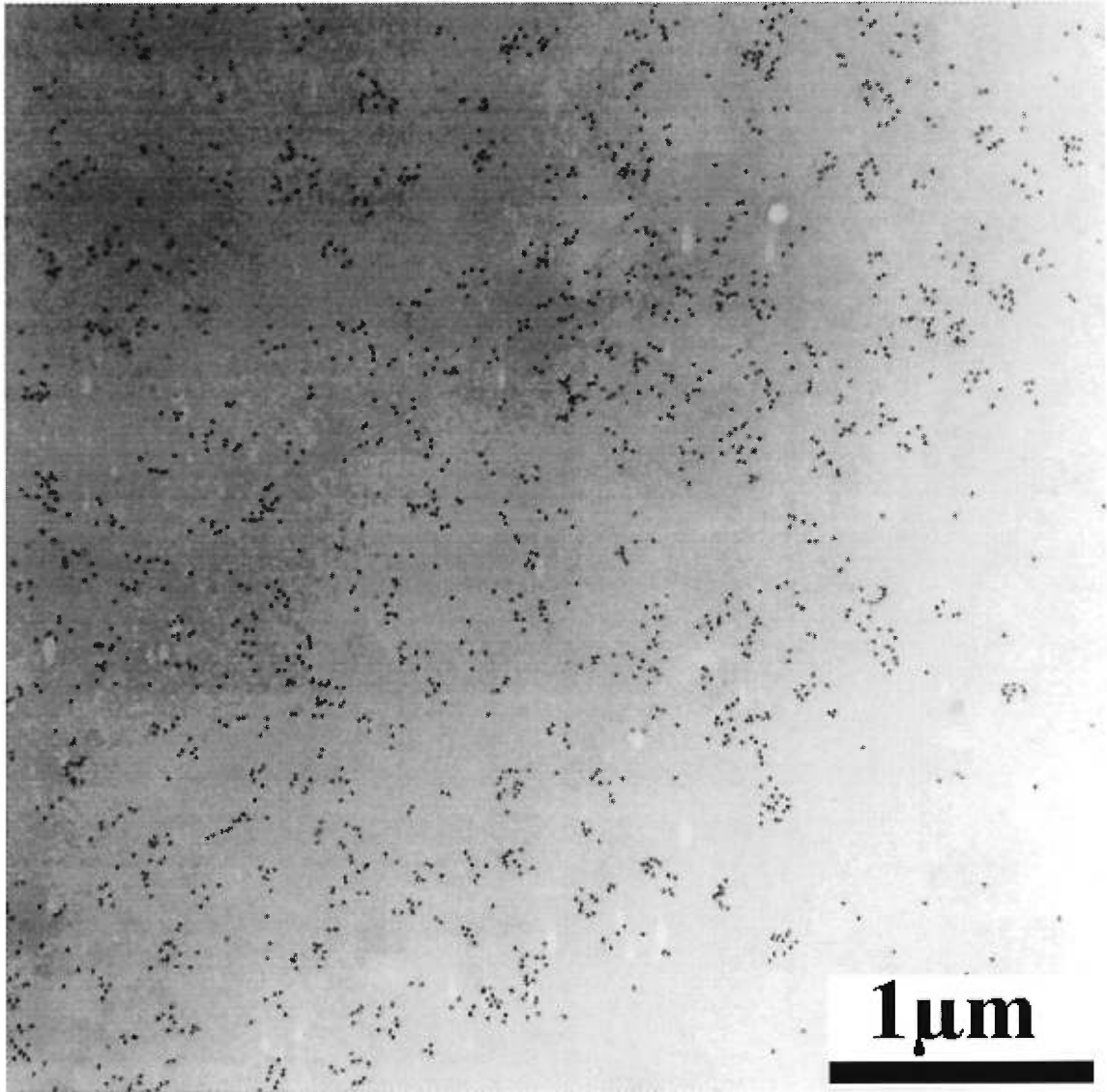


Figure 1b : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.

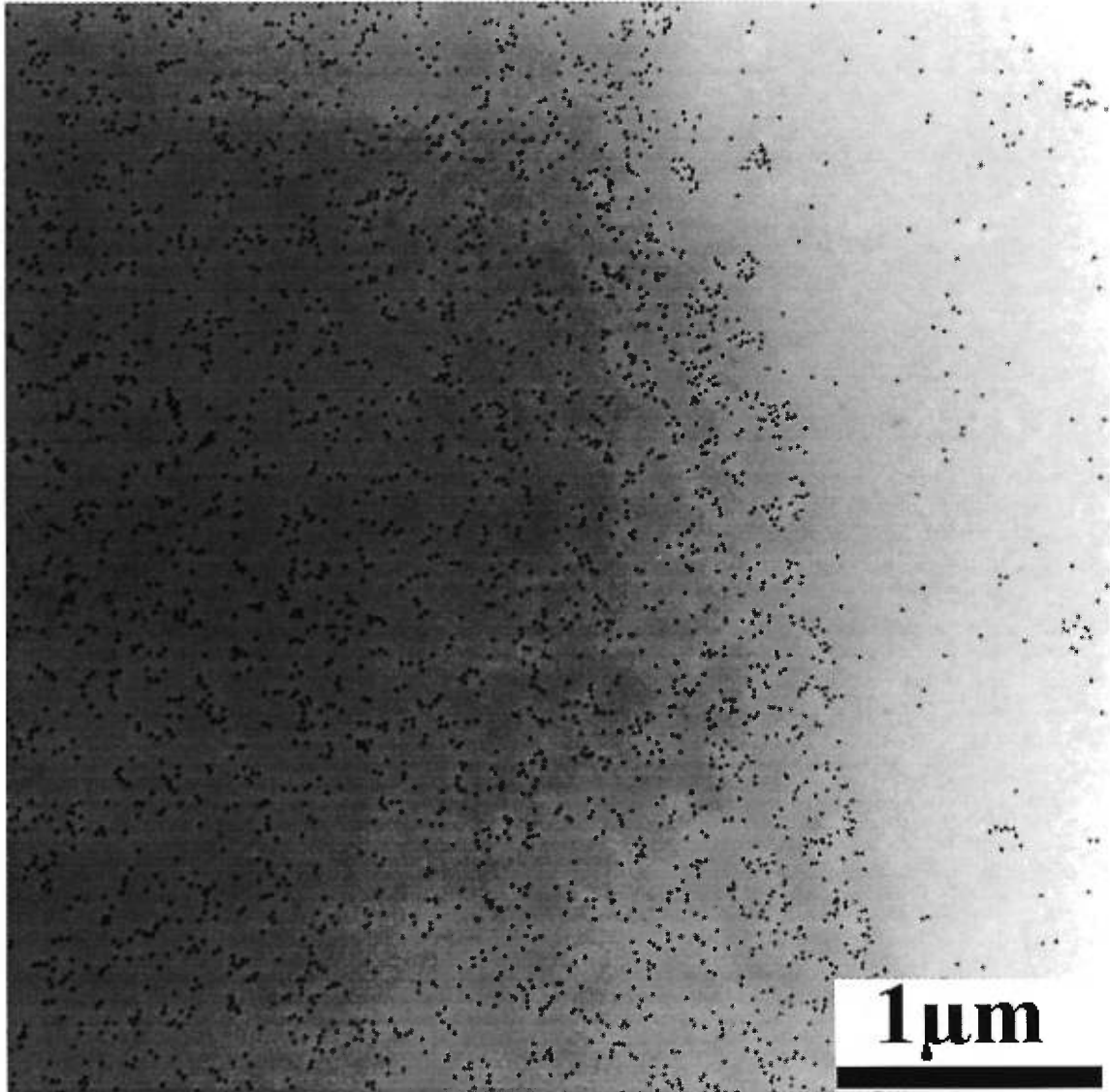


Figure 1c : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.

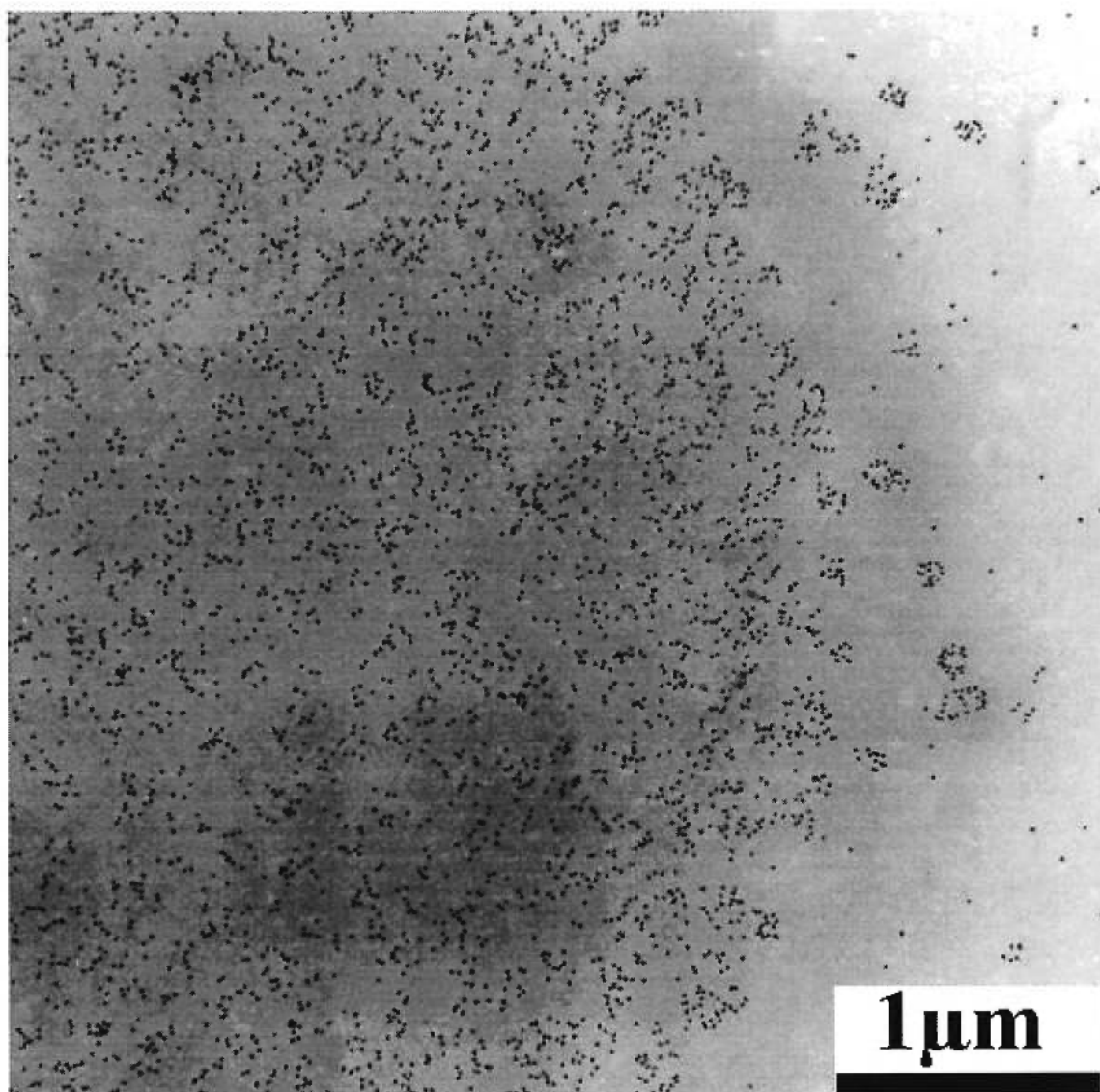


Figure 1d : Noyau interphasique de lymphocyte exposé à du nickel pur et marqué à l'EM-ISEL.

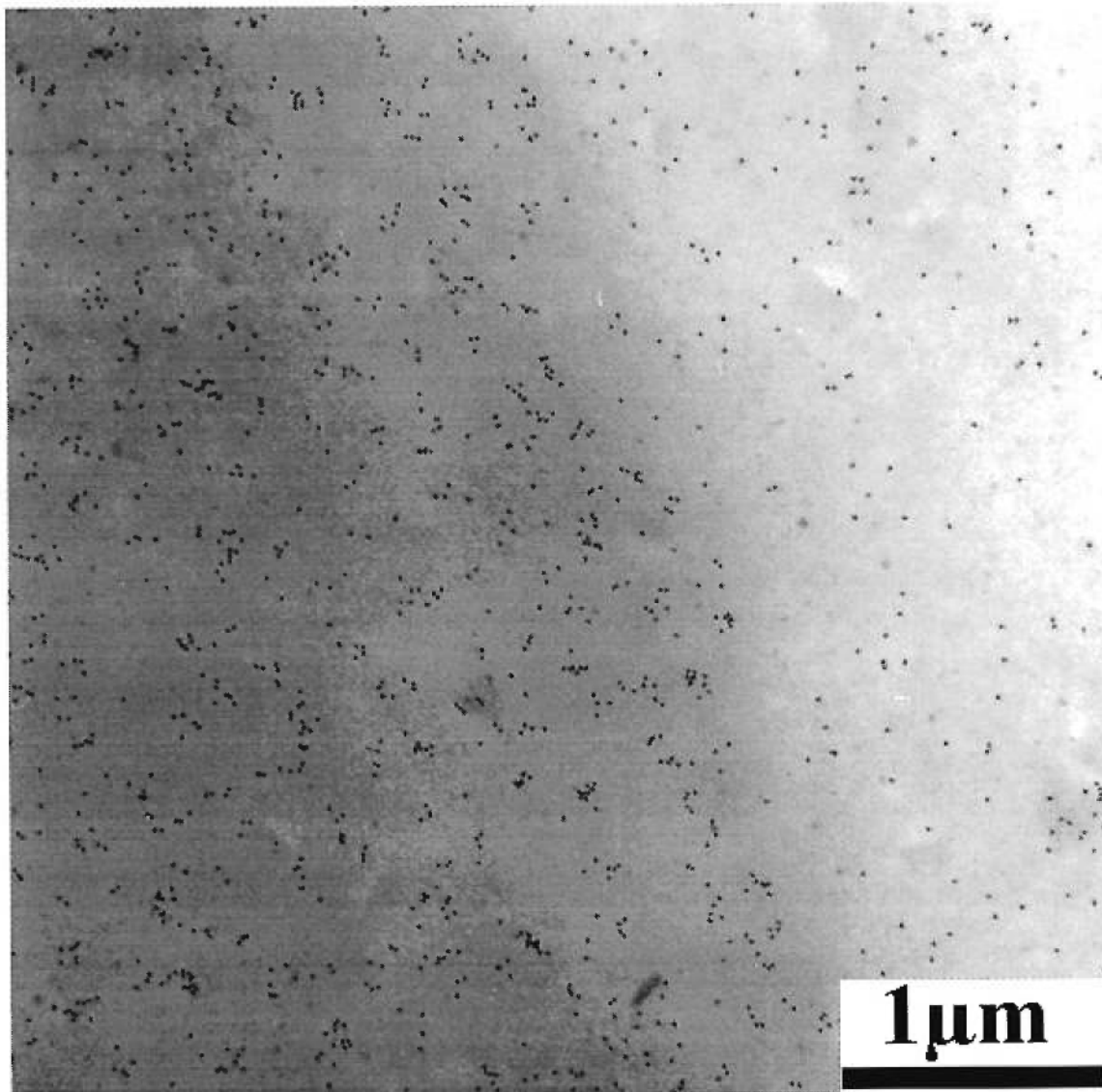


Figure 1e : Noyau interphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.

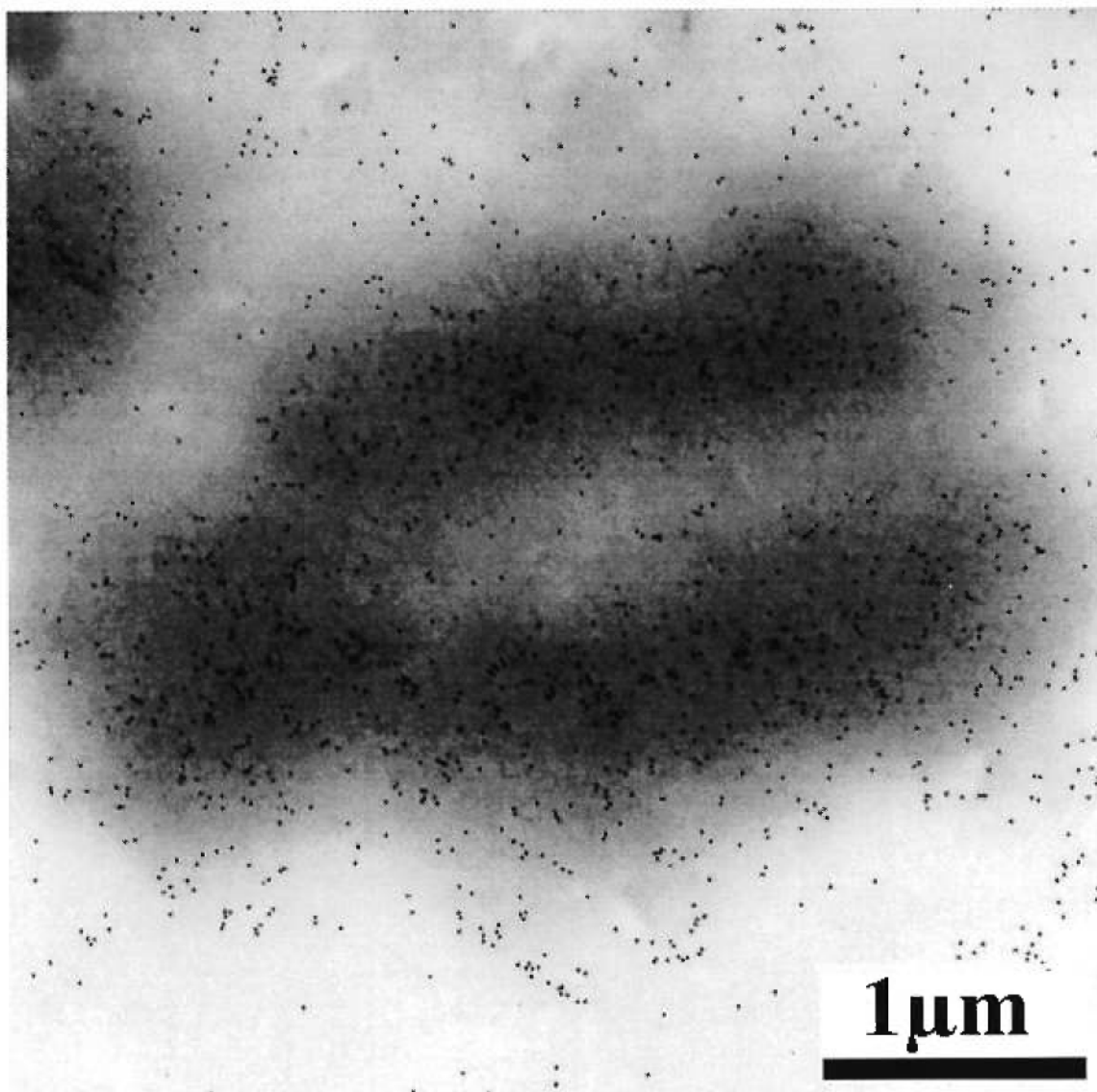


Figure 2a : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du nickel-titane et marqué à l'EM-ISEL.

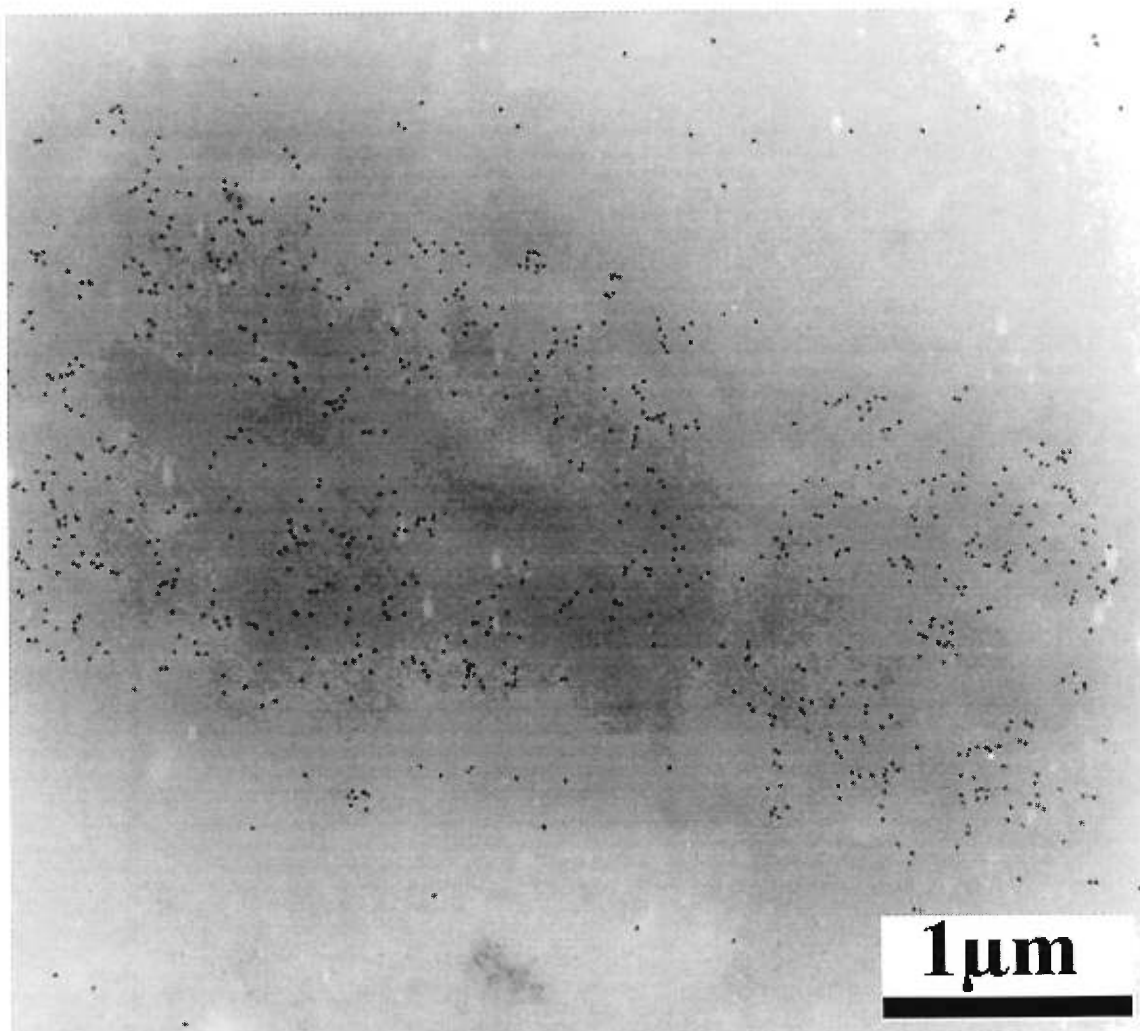


Figure 2b : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du titane pur et marqué à l'EM-ISEL.

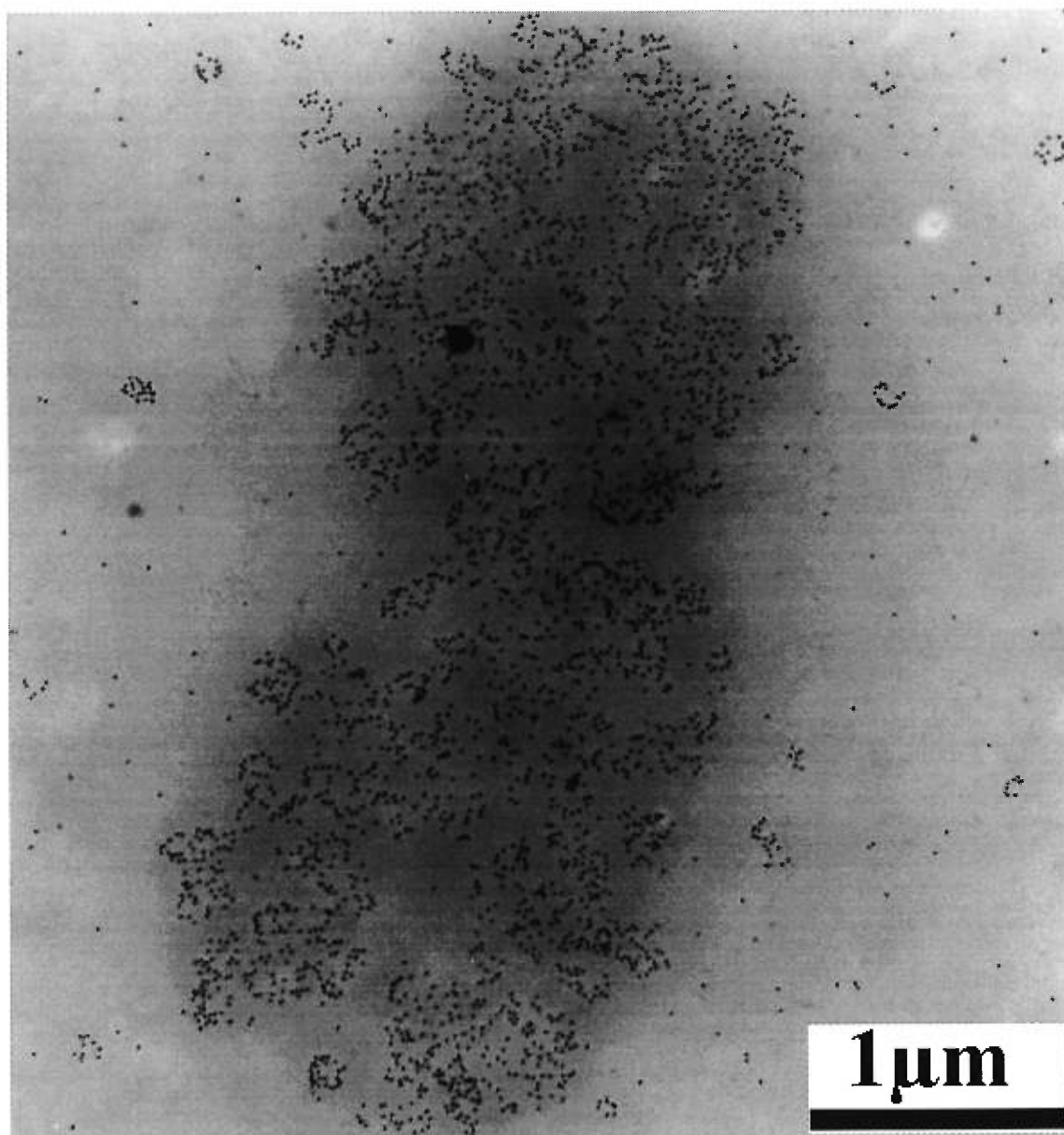


Figure 2c : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à de l'acier inoxydable et marqué à l'EM-ISEL.

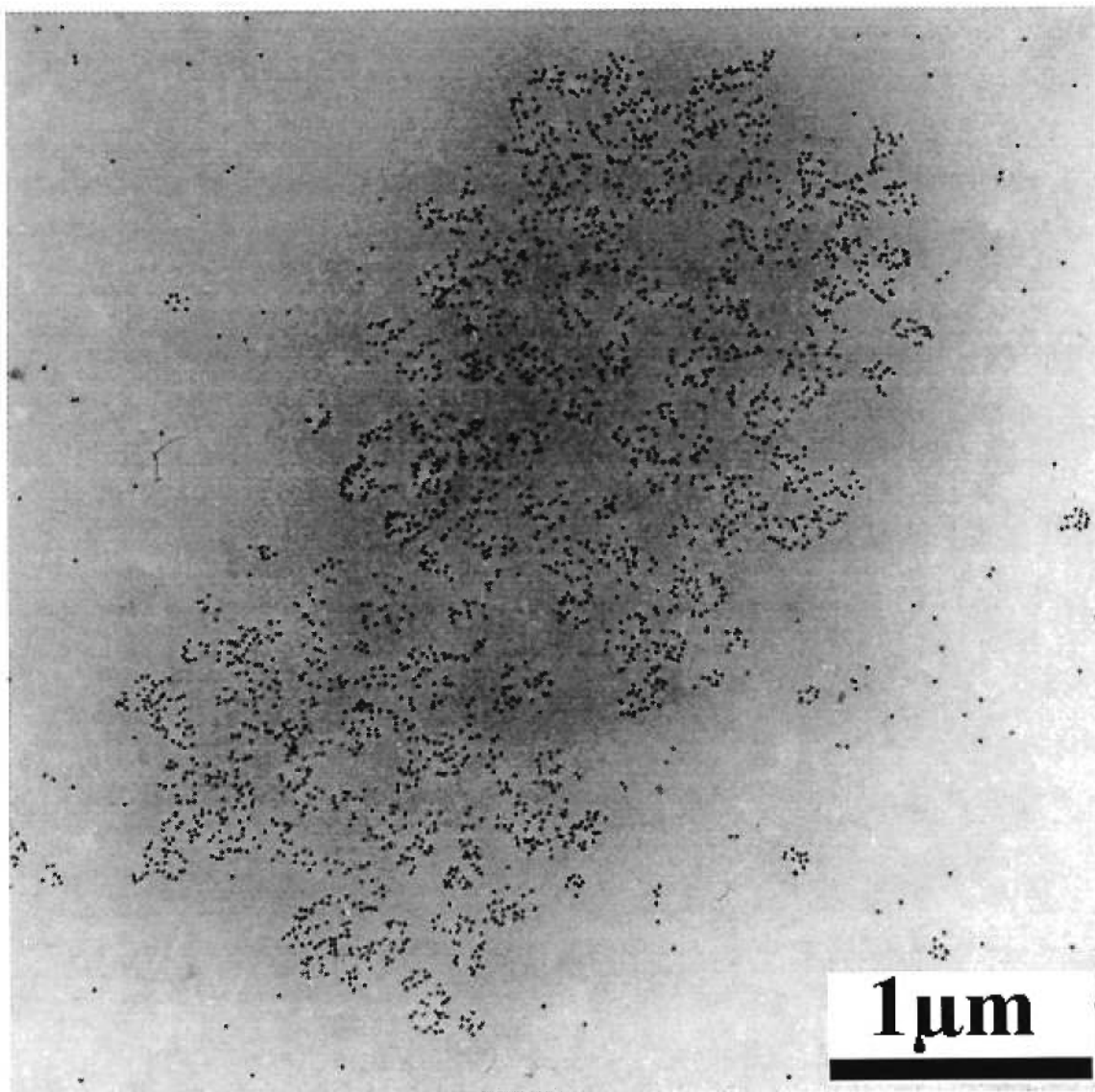


Figure 2d : Chromosome métaphasique de lymphocyte exposé à du nickel pur et marqué à l'EM-ISEL.

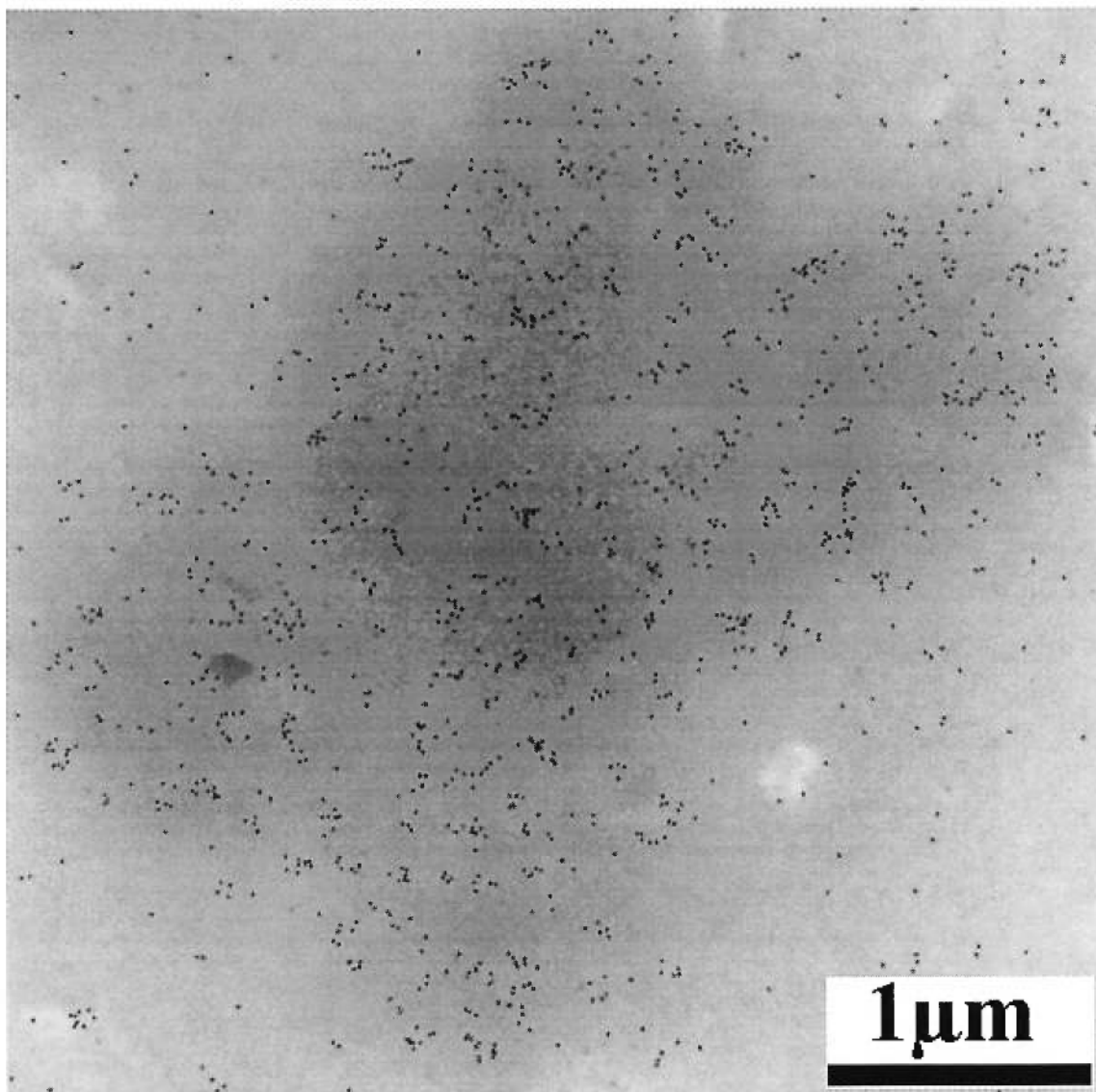


Figure 2e : Chromosome métaphasique de lymphocyte non exposé et marqué à l'EM-ISEL.

DISCUSSION GÉNÉRALE

CARCINOGENICITÉ MÉTALLIQUE

Takamura et al. (1994) ont affirmé que tout matériau qui possède la capacité de se solubiliser dans le corps doit être testé pour sa carcinogénicité potentielle, et ceci selon lui est même une responsabilité sociale. La carcinogénicité potentielle des nouveaux biomatériaux doit être en effet prise au sérieux puisque des tumeurs malignes ont déjà été associées à des cas cliniques (Case et al., 1996; Cole et al., 1997; Coleman, 1996; Gillespie et al., 1996; Sunderman, 1989; Vahey et al., 1995; Visuri et al., 1996; Wapner, 1991). Cependant les études animales et humaines associant le développement de tumeurs malignes, particulièrement des sarcomes, à des prothèses métalliques en orthopédie sont encore modestes en nombre et même peut-être sous estimées, mais s'accumulent suffisamment pour s'en soucier (Bouchard et al., 1996, Coleman, 1996, Sunderman, 1989; Vahey et al., 1995). En effet, des études de cas carcinogénicité ont été effectuées pour des patients ayant subi l'implantation d'une prothèse métallique. On leur impute même la responsabilité du retrait de la prothèse (Sunderman, 1989; Granchi et al., 1998). Pour vérifier cette hypothèse, certains souhaitent l'établissement d'un registre international rapportant les implantations de prothèses associées au développement de tumeurs, ainsi que des études épidémiologiques rétrospectives (Case et al., 1996; Coleman, 1996; Sunderman, 1989).

Les mécanismes induisant la formation de tumeurs demeurent encore très peu connus et la carcinogénicité métallique semble une énigme difficile à résoudre encore aujourd'hui. Cependant on soupçonne les produits de dégradation de certaines prothèses

métalliques tels que les particules et ions métalliques (relargués localement ou dans la circulation systémique) qui accompagnent des phénomènes tels que le descellement et la corrosion, d'être des facteurs initiant et stimulant de certains processus néoplasiques (Sunderman, 1989; Bouchard et al., 1996; Gillespie et al., 1996; Doran et al., 1998). La corrosion, par exemple, peut parvenir à détacher les constituants ioniques des substrats métalliques (Galante et al., 1991); il en sera question un peu plus loin. Un processus électrochimique de conduction des électrons serait aussi impliqué. Une conséquence pourrait être l'induction de lésions d'ADN. Deux modes d'action principaux semblent être d'importance. Il y a surtout la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactives (EOR) qui pourrait produire des dommages oxydatifs dans les bases azotées. D'autre part, les ions pourraient interférer dans le processus de réparation et de réplication de l'ADN. Voici donc, de façon non exhaustive comment les métaux ont la capacité d'interagir par leur potentiel génotoxique.

Génotoxicité : mécanismes généraux

Plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans la carcinogénicité métallique. Certains métaux atteignent, sous forme ionique, le noyau cellulaire sans être capturés par des ligands (Beyersmann et Hartwig, 1993). De plus, les ions métalliques peuvent être impliqués directement et réagir intimement avec l'ADN. Certains cations, par exemple, peuvent se lier aux groupements négatifs des acides nucléiques tels que les bases azotées et les groupements phosphates, altérant ainsi la structure primaire et par extension les structures secondaire et tertiaire de la molécule d'ADN (Kasprzak, 1995; Cohen et al., 1991).

Les dommages indirects peuvent résulter de l'activation d'intermédiaires métalliques formés en présence d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène de façon à produire des dommages oxydatifs à l'ADN (Kasprzak, 1995). Les réactions rédox catalysées par les espèces ioniques (transfert catalytique d'électrons) seraient les grands responsables : il s'agit des réactions de types Fenton et Haber-Weiss qui utilisent comme réactifs l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces deux composés provenant du métabolisme cellulaire réagiraient avec les ions métalliques. Les principales espèces oxygénées actives produites seraient le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et l'oxygène singlet (1O_2) selon Sugiyama (1994). Le radical hydroxyle semble particulièrement plus réactif et dommageable (Kasprzak, 1995). Il est reconnu pour sa capacité d'interaction avec toutes les composantes de la chromatine nucléaire. Il peut modifier les bases azotées, le désoxyribose et peut aussi produire des pontages ADN-ADN et ADN-protéines (Kasprzak, 1995; Klein et al., 1991). La capacité clastogénique du radical hydroxyle est principalement représentée par sa réaction avec la guanine, l'une des bases azotées de l'ADN. La production de 8-hydroxyguanine (8-OHG), une lésion de l'ADN prémutagénique, en résulterait (Sugiyama, 1994; Hartwig, 1995). En effet, les bases oxydées sont mutagéniques puisque'elles bloquent la réplication de l'ADN et produisent ainsi des substitutions (Snow, 1992). Elles sont génotoxiques pour les cellules de mammifères entre autres où on note des augmentations d'échanges entre chromatides-sœurs (ECS) et d'aberrations chromosomiques de type lacunes ou cassures (Snow, 1992).

Les biomatériaux métalliques et leurs composantes

Les biomatériaux métalliques utilisés en orthopédie sont les suivants : le titane et ses alliages, les aciers inoxydables, les alliages à base de cobalt et super alliages, ainsi que les alliages à mémoire de forme (Roussin, 1992). Les éléments métalliques qui composent le biomatériau peuvent donc entrer en jeu et interagir avec le noyau cellulaire. Voici les espèces métalliques qui composent les biomatériaux orthopédiques. Elles sont énumérées ici entre parenthèses et par ordre décroissant d'importance dans la composition (Roussin, 1992): alliages à base de titane (Ti, Al, V, Fe, Nb, Zr) et titane pur (Ti, Fe), aciers inoxydables (Fe, Cr, Ni, Mn, Mo, V, Si), alliages à base de cobalt ou supers alliages (Co, Cr, Mn, W, Mo, Ni, Nb, Ta, Si), et alliages à mémoire de forme (Ti, Ni, Cu). Parmi ces espèces métalliques, une liste non exhaustive des éléments ioniques qui ont démontré une susceptibilité à la carcinogénicité dans le passé a été dressée.

Espèces génotoxiques

Nickel

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent, le nickel est une des composantes de plusieurs biomatériaux orthopédiques. De plus, les protéines qui requièrent certains ions essentiels pour leur fonctionnement réagissent avec les cations métalliques comme le nickel. Ce dernier, sous forme ionique, peut en effet s'associer avec des protéines nucléaires telles que les polymérases de façon à causer de l'interférence dans les mécanismes comme la réplication et la réparation de l'ADN (Kasprzak, 1995). Des espèces métalliques tels que le nickel, le cobalt, le plomb et le

cadmium ont en effet démontré dans le passé une certaine capacité d'inhiber la réparation de l'ADN (Hartwig et al., 1990; Hartwig et al., 1991). Ces interactions pourraient bien représenter le mécanisme prédominant en génotoxicité de ces métaux (Hartwig, 1995).

En effet, grâce à sa capacité à traverser les membranes, le nickel compétitionne avec des ions essentiels tel que le magnésium qui est requis à certains sites de polymérase ou de ligase pour une réparation adéquate de l'ADN (Wapner, 1991). Le nickel aurait une conformation tridimensionnelle semblable à celle du Mg(II) et lui offrirait une compétition inhibitrice en tant que co-facteur essentiel de la réparation (Hartwig, 1995; Dally and Hartwig, 1997). Comme le nickel est un activateur inefficace de la polymérase, il décroît ainsi la fidélité de la réplication et réparation de l'ADN (Snow, 1992).

On reconnaît surtout l'activité mutagénique du Ni lorsqu'il est combiné aux rayons ultraviolets (UV) avec, comme résultat, des pontages ADN-ADN de photodimères thymine-thymine (Beyersmann et Hartwig, 1993). La comutagénicité du Ni a aussi été démontrée avec l'usage de rayons X (Christie, 1989). Il semble que l'initiation de l'excision/réparation représente l'étape véritable où les ions magnésium sont déplacés par le nickel. On a pu démontrer la réversibilité de cette action du nickel grâce à l'addition de magnésium (Hartmann et Hartwig, 1998; Hartwig et al., 1991; Hartwig, 1995).

Le Ni pourrait de plus avoir un impact sur l'excision de lésions oxydatives telle que la 8-OHG. Cette dernière, occasionnée par la lumière visible, serait bloquée

complètement par l'addition de 250 μ M de Ni (Dally and Hartwig, 1997). *E. coli* reconnaît cette lésion par la formamidopyrimidine-DNA glycosylase (protéine Fpg) qui enlève les purines modifiées en hydrolysant le lien qu'elles établissent avec le sucre. La protéine Fpg, également présente dans les cellules eucaryotes, pourrait être inactivée par le nickel une fois en compétition inhibitrice avec le magnésium. Hong et al. (1997) semble avoir démontré ceci en provoquant une diminution de la production 8-OHG, des micronoyaux et des pontages ADN-protéines en ajoutant du carbonate de magnésium aux cellules en culture.

Les composés nickel en particules ou cristallins (ex. nickel métallique, NiS, Ni₃S₂) ayant une solubilité intermédiaire semblent plus carcinogènes que les composés solubles ou les sels (NiSO₄, NiCl₂) (Hartwig, 1995; Snow, 1992; Sugiyama, 1994). Ceci serait possiblement dû à un mode différentiel de livraison de ces composés nickel particulaires (Snow, 1992). Les particules seraient phagocytées et puis dissoutes par acidification dans les lysosomes, une réaction très efficace qui permet d'obtenir une grande augmentation d'ions nickel intracellulaires. Le couple rédox Ni(II)/Ni(III) pourrait être activé: la production d'espèces oxygénées réactives est donc dans le cas du nickel aussi plausible comme mécanisme (Sugiyama, 1994). Le nickel pourrait par exemple lui-même réagir avec le H₂O₂, produit par les cellules phagocytiques, et ainsi générer des EOR. Il y aurait ainsi une augmentation de 8-OHG et des dépurinations de l'ADN (Hong et al., 1997; Snow, 1992). Certains suggèrent cependant que le nickel doive au préalable former une association ou complexe avec des ligands biologiques tels que des protéines, des oligopeptides ou l'ADN afin d'être en mesure de réagir avec le H₂O₂ (Kasprzak, 1995). Le Ni²⁺ peut aussi se lier à des protéines nucléaires spécifiques

comme l'histidine (Sunderman, 1993). Le Ni(II) pourrait enfin agir en inhibant l'activité d'anti-oxydants tels que la catalase par exemple (Hartwig, 1995).

Le nickel produit ainsi des cassures, des pontages ADN-protéines (Kasprzak, 1995) et des aberrations chromosomiques (lacunes et chromosomes dicentriques), spécifiquement associés aux régions hétérochromatiques (Dally and Hartwig, 1997; Patierno et al., 1985; Snow, 1992). Le nickel est utilisé à titre de contrôle positif dans les essais *in vivo* nécessitant l'injection de poudres carcinogéniques. Il induit des tumeurs malignes suite à l'implantation intramusculaire, intra-rénale, sous-cutanée, intra-testiculaire, intra-oculaire et intra-articulaire chez le rat (Sunderman, 1989; Lewis et al., 1995; Lewis et Sunderman, 1996). Il faut toutefois noter que certains auteurs ont découvert une capacité de transport du nickel par le sang (couplé à l'albumine par exemple) et son élimination rapide via l'urine (Merritt et Brown, 1996).

Chrome

Le chrome fait aussi partie des espèces métalliques génotoxiques. Il est une des principales composantes des aciers inoxydables. C'est un élément dont l'état d'oxydation fait varier sa toxicité. Prenons par exemple les valences Cr(III) et Cr(VI) que l'on retrouve après l'implantation de prothèses en CoCr et acier inoxydable (Merritt et Brown, 1995). Le chrome hexavalent ou ion chromate, Cr(VI), représente la forme de toxicité initiale (Beyersmann et Hartwig, 1993; Snow, 1992). Pour ce faire, le Cr(VI) semble pouvoir passer facilement à travers de la membrane cellulaire par le transport du sulfate, du phosphate et d'autres anions (Beyersmann et Hartwig, 1993; Sugiyama, 1994; Kasprzak, 1995; Singh et al., 1998). L'ion chromate en soi n'est pas génotoxique

et ne réagit ni avec l'ADN, ni avec l'ARN ou même avec les protéines (Singh et al., 1998), mais il pourrait être rapidement réduit sous forme d'intermédiaires instables tels que le Cr(V) et le Cr(IV) par des réducteurs cellulaires tels que certains composés sulfhydryles non protéiniques (SHNP), le H₂O₂, les vitamines B₂ et C, ainsi que certaines flavoenzymes (Snow, 1992; Sugiyama, 1994).

La réduction intracellulaire du Cr(VI) en Cr(III) provoque la production de EOR clastogéniques. En effet, on a montré la capacité des ions Cr(VI) de réagir avec le O₂⁻ de façon à générer du Cr(V) qui peut ensuite réagir avec le H₂O₂ et produire des radicaux ·OH (réaction de Fenton). Cette réaction peut aussi contribuer à régénérer le Cr(VI) et catalyser les réactions de type Haber-Weiss (Sugiyama, 1994). Le chrome(III) semble plus stable. C'est ce qui expliquerait pourquoi certaines études *in vitro* avec le Cr(III) ne donnent pas de résultats significativement toxiques selon Howie et al. (1996). Grâce au transport du Cr(VI) à l'intérieur de la cellule, le chrome(III) aurait tendance à s'accumuler dans celle-ci (Wapner, 1991) et ainsi dans tout le corps humain : il n'est donc pas éliminé facilement *in vivo* (Merritt et Brown, 1996).

Autres espèces génotoxiques

Le cobalt est aussi considéré comme un agent carcinogène. Les sels de cobalt ont occasionné une transformation néoplastique en culture cellulaire (Doran et al., 1998), tandis que des poudres de cobalt ont induit l'apparition de sarcomes aux sites d'implantation (Sunderman, 1989). Aussi, certains ont démontré que lorsque des alliages

CoCr sont implantés, il s'agit des ions cobalt (II) et (III) qui sont relargués; il semble que les ions bivalents soient toutefois plus stables et plus toxiques (Howie et al., 1996). Effectivement, dans les cellules de mammifères, les ions Co(II) ont augmenté la fréquence de mutations induites par les UV (Hartwig et al., 1991). Le cobalt a de plus démontré qu'il pouvait, lui aussi, inhiber une étape de la réparation de l'ADN, soit la polymérisation ou la ligation, après excision des dimères thymine-thymine induites par les UV (Hartwig, 1991). Il pourrait se substituer, comme le fait le nickel, au magnésium employé comme co-facteur (Hartwig, 1995). Des poussières de cobalt ont aussi montré une certaine clastogénicité avec la capacité d'augmenter la production de radicaux hydroxyles et cassures simple-brin (Anard et al., 1997). Cependant, le cobalt semble occasionner de dommages oxydatifs à l'ADN, seulement une fois en complexe, comme c'est le cas avec le NADH (« Nicotinamide Adenine Dehydrogenase »): ce dernier catalyserait la réaction du Co(II) avec le H₂O₂. Les dommages génotoxiques du cobalt incluent les aberrations chromosomiques, ainsi que l'augmentation des micronoyaux et des ECS. Le cobalt en général serait toutefois graduellement transporté dans le sang par l'albumine et rapidement éliminé, tout comme le nickel, via l'urine (Merritt et Brown, 1996).

Espèces ayant une génotoxicité intermédiaire

On compte parmi les principales espèces métalliques ayant une génotoxicité intermédiaire, l'aluminium, le cuivre et le fer. Les sels d'aluminium (Al) ont en effet longtemps semblé avoir un effet suppresseur de la carcinogénicité de certains composés chez la souris: le diméthylnitrosamine, la 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxyde réductase et la 4-nitroquinoline 1-oxyde réductase pour n'en nommer que quelques uns

(Yamane et Ohtawa, 1979; Yamane et al., 1981). Toutefois, on a récemment remarqué que le Al(III) pouvait interagir avec la région de l'ADN qui se lie au facteur de transcription TFIIIA (une protéine de régulation, prototype d'une des plus grandes familles de facteurs de transcriptions eucaryotiques). En effet, les doigts de zinc N-terminaux du TFIIIA sembleraient être spécifiquement affectés par l'aluminium. Les ions Al(III) altéreraient la conformation de l'ADN et pourraient empêcher ces protéines régulatrices de se lier correctement à l'ADN. Ceci pourrait directement mener à la carcinogenèse (Hanas et Gunn, 1996).

Le cuivre (Cu), un élément essentiel, est sous contrôle physiologique. Avec ces ligands endogènes, le Cu semble posséder une moins grande accessibilité aux réactions qui sont sources de EOR. Sa capacité de générer de la 8-OHG et des cassures double-brin en présence de H₂O₂ a cependant récemment aussi été démontrée (Lloyd et al., 1998; Bal et al., 1997). Porter et al. (1997) ont remarqué la capacité des ions Cu(II) d'inhiber le travail d'ions magnésium dans l'activation de la 8-oxo-dGTPase. En effet, le cuivre semble interférer avec le Mg(II) en le déplaçant des sites d'activation de la 8-oxo-dGTPase responsable de la détoxication de la 8-oxo-dGTP (une autre modification oxydative de la guanine qui pourrait être incorporée dans l'ADN). Une inhibition de la 8-oxo-dGTPase par le cuivre pourrait représenter une étape importante de la carcinogenèse (Bialkowski et Kasprzak, 1998).

Le fer (Fe) est aussi un élément essentiel, mais qui peut être dommageable dans certaines réactions cellulaires. Dans les cellules intactes, ces dommages sont généralement évités grâce aux ligands tels que la transferrine, la lactoferrine,

l'hémoglobine et la myoglobine (Hartwig, 1995) : il est ainsi emmagasiné en Fe(III) que l'on considère moins dommageable que le Fe(II). Cependant il a été démontré que le fer forme des complexes avec la nitrilotriacétate (NTA) et ainsi échappe au contrôle effectué par la transferrine : le complexe Fe-NTA peut de cette façon pénétrer dans le noyau (Hartwig, 1993). Le NTA permettrait au Fe(II) de réagir avec le H₂O₂, et par conséquent de produire des radicaux hydroxyles. Le Fe(II) peut ainsi produire des cassures double-brin et de la 8-OHG, via la réaction de Fenton (Hartwig, 1995; Lloyd et al., 1998). On a même observé de l'apoptose après injection de Fe-NTA dans des cellules épithéliales rénales (tubulaires proximales) chez la souris (Kawabata et al., 1997). Le NTA est donc un ligand déclencheur de la génotoxicité du fer (Hartwig, 1993).

Espèces biocompatibles ou chémoprotectrices

Le titane pur est un matériau biocompatible. Il a été classifié comme contrôle clinique à titre comparatif (ISO, 1994; ISO, 1996). Dans la littérature, la cytocompatibilité du titane et de ses alliages a aussi été confirmée (Assad et al., 1994; Doran et al., 1998; Lincks et al., 1998; Putters et al., 1992; Rose et al., 1999; Ryhanen et al., 1997; Ryhanen et al., 1998; Trépanier et al., 1999; Wang et Li, 1998; Wever et al., 1997). De plus, les études qui ont appréhendé la carcinogénicité (Takamura et al., 1994) et la génotoxicité (Assad et al., 1997; Assad et al., 1998; Assad et al., 1999; Wang et al., 1998; Wever et al., 1997) du titane pur et de ses alliages n'ont pas relevé de réaction mutagénique. Wang et al. (1998) ont même démontré une capacité d'attachement des cellules au titane et ses alliages; la production de fine capsules fibreuses, un bon indicateur de biocompatibilité lors de l'implantation, est aussi observée (Ayers et al.,

1999; Gotman, 1997; Rhalmi et al., 1999; Simske et Sachdeva, 1995; Takeshita et al., 1997; Trépanier et al., 1999). Une couche d'oxyde (dioxyde de titane) se forme spontanément dans un milieu oxygéné à la surface du Ti (Duerig et al., 1997; Ryhanen et al., 1997). On observe aussi que la biocompatibilité du titane semble proportionnelle à l'épaisseur de cette couche (Huang et al., 1994). Cette couche passive lui confère donc une résistance à la corrosion (Kim et Johnson, 1999; Chen et al., 1998; Ryhanen et al., 1997) et le relargage d'ions titane semble très faible dans des conditions d'implantation (Kanematu et al., 1990). En fait, il ne semble pas pouvoir s'ioniser: des particules de titane tout au plus ont déjà été observées *in vivo*, mais elles se recouvrent aussi d'une couche passive (Ryhanen, 1999). Ainsi, des réactions de toxicité, y compris de carcinogénicité, envers le titane n'ont pas été véritablement détectées dans la littérature. On reporte donc le titane pur dans la classe des biomatériaux biocompatibles.

Certaines espèces métalliques par ailleurs sont spécifiquement considérées pour leur action anti-carcinogène, ou du moins leur capacité de réduire les lésions d'ADN. Le molybdène (Mo) par exemple semble avoir des effets bénéfiques à titre d'agent supprimeur de tumeurs. Nakadaira et al. (1995) ont fait des études sur le Mo, et il semble en effet que ce métal inhibe la carcinogenèse gastrointestinale. Le molybdène a montré une capacité de prévenir les cassures d'ADN de même que les irrégularités du métabolisme du calcium (Ca) en stimulant la détoxification du diéthylnitrosamine (DENa) dans les cellules hépatiques de rats (Koizumi et al., 1995). Par contre, il pourrait exister une corrélation positive entre le molybdène et le cancer du pancréas chez la femme (Nakadaira et al., 1995). Le molybdène, sous forme de sel, mais non sous forme de particules, semble induire une transformation néoplastique en culture cellulaire

(Doran et al., 1998). Le molybdène des alliages métalliques est toutefois généralement éliminé graduellement via l'urine (Merritt et Brown, 1996).

Le manganèse se combine à la superoxyde dismutase (SOD). Il peut ainsi agir à titre d'anti-carcinogène en protégeant la cellule des espèces oxygénées réactives. Par exemple, la promotion de la carcinogénèse dans des cellules d'épiderme semble réversible avec l'expression de la Mn-SOD (Amstad et al., 1997). Le manganèse est utilisé comme contrôle négatif dans les études de toxicité *in vivo* nécessitant l'utilisation de poudres métalliques (Lewis et al., 1995; Lewis et Sunderman, 1996).

Le vanadium (V), un autre élément essentiel, a montré un effet chémoprotecteur pour contrer l'hépatocarcinogénèse chez le rat. Après injection intrapéritoniale de DENA, l'addition de vanadium a montré un effet anti-tumoral lors de l'étape d'initiation des tumeurs (Bishayee et Chatterjee, 1995; Bishayee et al., 1997). Toutefois, l'ADN traité avec du V(III) et du H₂O₂ semble produire du 8-OHG et des scissions double-brin (Lloyd et al., 1998). Cette toxicité dépendrait principalement de sa solubilité plutôt que de son état d'oxydation ou sa valence (Wapner, 1991).

Conséquences de l'exposition ionique

Les conséquences de la génotoxicité métallique sont nombreuses. Certaines délétions et substitutions occasionnées durant la mutagenèse pourraient par exemple induire l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation d'anti-oncogènes. Certains auteurs ont par ailleurs démontré que l'activation de proto-oncogènes et l'inhibition d'anti-oncogènes (tel que le gène p53, un des gènes déclencheurs de l'apoptose)

pouvaient mener à la formation de néoplasmes et éventuellement à la production de métastases (Weinberg, 1991). Il a été mis en évidence, par exemple, pour le nickel une capacité soit d'occasionner des mutations ponctuelles dans le gène p53 ou de provoquer une perte du bras court du chromosome 17 (Snow, 1992). Les lésions d'ADN sont considérées comme l'un des mécanismes responsables des mutations et de la carcinogénicité (Nose et Okamoto, 1983). Cette dernière peut résulter autant des dommages à l'ADN, que des interactions avec les enzymes de réparation.

ESSAIS QUANTITATIFS DE GÉNOTOXICITÉ *IN VITRO*

Justification

Plusieurs auteurs ont suggéré le développement d'essais quantitatifs capables d'étudier les mécanismes inhérents au processus cellulaire menant à la génotoxicité métallique (Hartwig, 1995; Sunderman, 1989). L'une des recommandations de Sunderman (1989) porte ainsi spécifiquement sur l'application et la validation d'essais quantitatifs afin d'étudier la carcinogénicité des espèces métalliques présentes dans les prothèses orthopédiques, et ce, en utilisant entre autres des poudres de métal. Cela pourrait aider à prédire les dangers de carcinogénicité des particules d'abrasion et des ions métalliques relargués par les prothèses métalliques (Sunderman, 1989). De plus, puisque les études *in vivo* tardent à établir un consensus sur la carcinogénicité métallique, certains suggèrent des essais *in vitro* de pré-screening (Doran et al., 1998).

On spécule en effet que certains modèles animaux soient difficiles à interpréter à cause du manque de tests quantitatifs (Howie et al., 1996). Par exemple, il semble que les essais *in vitro* soient meilleurs pour détecter des différences biologiques quelques

fois subtiles. Les essais *in vitro* pourraient représenter une façon de détecter d'importantes différences significatives pour l'investigation des mécanismes spécifiques d'interactions cellulaires avec le biomatériau (Howie et al., 1996; Rogers et al., 1997). On peut également profiter du fait que les essais de génotoxicité *in vitro* peuvent s'effectuer en parallèle avec ceux sur la réponse immune, puisque dans les deux cas on peut faire usage de lymphocytes. Ces essais de types présélectifs pourraient refléter des réactions qu'on obtiendrait avec les tissus (Merritt et Brown, 1996). Sans extrapoler outre mesure les résultats *in vitro* à des situations cliniques (Amstutz et al., 1996), on pourrait sans doute comparer les résultats *in vitro*, *in vivo* et possiblement les essais précliniques.

Techniques « *in situ* end-labeling »

EM-ISEL

Dans le cas des métaux, certains essais *in vitro* avec des cellules de mammifères se sont révélés d'intéressants outils pouvant obtenir des informations sur les mécanismes d'actions des ions. Dans ce présent travail nous avons d'ailleurs adapté une technique EM-ISEL permettant une quantification des cassures simple-brin d'ADN causés par des produits de réactions rédox ou bien des interférences lors de la réparation du génome. Les techniques « *in situ* end-labeling », ont été baptisées ainsi pour leur habilité à détecter les terminaux hydroxyles 3' libres aux abords des lésions. Elles peuvent en effet détecter des cassures simple-brin et double-brin occasionnées directement ou indirectement par les métaux. Pour se faire, les techniques ISEL utilisent un marqueur analogue à un des nucléotides de l'ADN: la thymidine est remplacée par de la biotine-dUTP, quoi qu'une alternative est de remplacer l'adénine par de la biotine-dATP (Chen

et al., 1997). On aurait très bien pu aussi utiliser la digoxigénine couplée à de l'uridine triphosphate puisque ce nucléotide analogue est aussi détectable via ces mêmes réactions immunocytochimiques (Coates et al., 1995; Inoki et al., 1997).

Dans le cas de l'EM-ISEL, nous avons utilisé des anticorps anti-biotine (ou anti-digoxigénine) conjugués à de l'or colloïdal à titre de rapporteur moléculaire (de l'or immunologique pour l'observation en microscopie électronique à transmission). Un des avantages est donc certainement la capacité de comptabiliser ces particules d'or par l'analyse d'images. Pour ce faire, le programme « NIH image » disponible sur l'internet a été d'une grande utilité et plusieurs travaux en font déjà fait usage (Assad et al., 1998; Assad et al., 1999; Hayashi et al., 1998; Inoki et al., 1997). Si on souhaite se limiter à une observation en microscopie photonique avec fluorescence, la technique est aussi adaptable à d'autres types de rapporteurs tels que les anticorps conjugués à de la phosphatase alcaline ou de la peroxydase (immunoperoxydase). On peut maintenant aussi incorporer des nucléotides déjà conjugués à de la fluorescéine sans utiliser d'anticorps (Ketabchi et al., 1998). Il faut toutefois noter que les analyses microscopiques avec fluorescence doivent être effectuées presque sur le champ puisque les marqueurs fluorescents sont aussi fugaces. De plus, dans ce dernier cas, la quantification est donc beaucoup moins facile.

TUNEL

Mise à part l'EM-ISEL, qui utilise la polymérase I de l'ADN (ou simplement le fragment Klenow pourvu de l'activité de polymérisation dans le sens 5'→3'), d'autres techniques qui marquent les terminaux 3'OH ont été développées en parallèle. Il y a, par

exemple, la technique « Terminal deoxynucleotidyl Transferase » (TdT) qu'on appelle aussi TUNEL pour « TdT-mediated bio-dUTP nick end-labeling ». La grande différence avec l'EM-ISEL est que la TdT, contrairement à la polymérase I, ne requiert pas de matrice (« template ») pour transférer les nucléotides en solution. Elle a donc la capacité de marquer tous les terminaux hydroxyles 3' qu'ils soit libres ou non (Didenko et Hornsby, 1996; Mundle et Raza, 1995b). Selon certains auteurs, cela confère à la technique TUNEL une capacité de marquage légèrement supérieure à celle obtenue avec l'EM-ISEL (Fujita et al., 1997; Migheli et al., 1994; Migheli et al., 1995). Cependant, la technique TUNEL semble avoir une moins grande facilité que l'EM-ISEL à détecter des changements plus subtiles de génotoxicité, en plus d'occasionner un plus grand marquage non spécifique (Fujita et al., 1997; Migheli et al., 1994).

L'avantage: détection de l'apoptose

Les techniques EM-ISEL et TUNEL ont donc toutes les deux la capacité de détecter les terminaux 3'OH et ce, quelle que soit l'origine de ces derniers. On a en effet remarqué que ces terminaux peuvent être aussi le résultat de l'activité de la DNase I : une endonucléase qui s'attaque préférentiellement aux sites 3'OH-P'5 et qui dégrade ainsi l'ADN, principalement lors de l'apoptose (Bernadette et al., 1997; Didenko et Hornsby, 1996; Hayashi et al., 1998). On a découvert que ces terminaux hydroxyles 3' semblent spécifiques aux cellules apoptotiques, puisqu'ils sont présents à un taux cent fois supérieur dans les cellules nécrotiques selon Didenko et Hornsby (1996). On devine donc ici une autre application concrète pour ces techniques : la détection de l'apoptose. Les techniques qui marquent les terminaux 3'OH représentent donc des méthodes de choix pour investiguer en détail les événements moléculaires apoptotiques.

L'apoptose est en fait un processus programmé génétiquement pour l'auto-destruction de la cellule avec une participation active de la cellule mourante (Fujita et al., 1997). Elle représente la façon que possède l'organisme de contrebalancer certains processus tumoraux (Drachenberg et al., 1997; Gaffney et al., 1995; Hawkins et al., 1997; Migheli et al., 1994; Migheli et al., 1995; Mundle et al., 1995; Schubert et al., 1998). C'est aussi un moyen de se débarrasser de cellules inutiles au cours de la morphogenèse (Nonclercq et al., 1997; Smith et Haaf, 1998) et de réduire la cellularité lors de la guérison tissulaire et la cicatrisation (Betz et al., 1997). Enfin, l'apoptose représente aussi une façon de maintenir l'homéostasie corporelle : le cycle menstruel en est un bon exemple (Inoki et al., 1997). L'apoptose s'accompagne de changements morphologiques cellulaires. On remarque une réduction du volume cellulaire, des noyaux pycnotiques, une condensation accrue de l'ADN, des bourgeonnements membranaires. L'intégrité de la membrane cellulaire est maintenue et, mis à part le noyau, il y a préservation morphologique des autres organites (Bernadette et al., 1997; Fujita et al., 1997; Ketabchi et al., 1998; Hayashi et al., 1998; Migheli et al., 1994; Wijsman et al., 1993).

Les processus moléculaires intracellulaires qui mènent à l'apoptose ne sont toutefois pas encore très bien compris. Le seul qu'on connaisse semble être un événement biochimique de dégradation (clivage) du génome nucléaire au niveau des «linkers» entre les nucléosomes et ce, par des endonucléases spécifiques comme la DNase dont il a été question plus tôt (Hawkins et al., 1997; Kressel et Groscurth, 1994; Nonclercq et al., 1997). La fragmentation procède selon un ordre très régulier dès le

début du processus de mort cellulaire tout en préservant une apparence cellulaire uniforme (Kressel et Groscurth, 1994). Ce processus semble en effet s'initier durant les premiers stades apoptotiques et ce, bien avant qu'on puisse détecter les changements morphologiques avec les techniques de marquages classiques (Drachenberg et al., 1997; Migheli et al., 1994). La détection de cette fragmentation de l'ADN est donc devenue la marque de commerce de l'apoptose, beaucoup plus que la simple observation histologique des noyaux (Chen et al., 1997; Migheli et al., 1994; Vallbo et al., 1998). L'EM-ISEL et TUNEL offrent donc la possibilité de détecter les cellules commises vers l'apoptose (pré-apoptotiques), même si elles ne présentent pas pour autant encore des modifications apparentes à part un début de condensation de chromatine (Chen et al., 1997; Inoki et al., 1997; Migheli et al., 1994; Migheli et al., 1995; Mundle et al., 1995; Schubert et al., 1998; Wijsman et al., 1993).

L'EM-ISEL et TUNEL sont devenues des essais de choix pour la détection de l'apoptose autant en cultures de cellules, qu'en sections tissulaires. La détection de la sensibilité des tumeurs aux radiations et aux traitements chimiques est sans doute une application clinique concrète de ces deux techniques (Ketabchi et al., 1998; Schubert et al., 1998; Vallbo et al., 1998). De plus, elles peuvent être appliquées à des échantillons tissulaires fixés à la formaline et dans la paraffine lors des analyses de routine. Il suffit d'un traitement aux protéinases (ou pepsine) pour perméabiliser les tissus (Ansari et al., 1993; Fujita et al., 1997; Hawkins et al., 1997; Inoki et al., 1997; Migheli et al., 1994; Wijsman et al., 1993). Ces essais sont adaptables aux sections histologiques fraîches, cryosections et même à celles provenant de matériel d'archives pour les analyses rétrospectives : matériels de biopsies et d'autopsies sont utilisables (Betz et al., 1997;

Didenko et Hornsby, 1996; Inoki et al., 1997; Lucassen et al., 1997; Migheli et al., 1994; Migheli et al., 1995; Smith et Haaf, 1998). Ces techniques ont une capacité de détection sensible et efficace, même dans les cas où le taux de cellules apoptotiques est bas comme dans le cas des tumeurs: on peut faire une analyse cellule par cellule à l'intérieur des tissus où on retrouve une population hétérogène de cellules apoptotiques, nécrotiques ou normales (Ketabchi et al., 1998; Drachenberg et al., 1997; Fujita et al., 1997; Hayashi et al., 1998; Kressel et Groscurth, 1994; Mundle et al., 1995). L'EMISEL et TUNEL permettent aussi de poursuivre en parallèle un étude immunohistochimique d'autres protéines intracellulaires afin de comparer le type de fragmentation des cellules apoptotiques et nécrotiques (Kressel et Groscurth, 1994).

FACTEURS D'INFLUENCES

Il existe un bon nombre de facteurs qui puissent influencer la détection de la génotoxicité potentielle des biomatériaux métalliques, autant dans les conditions *in vitro* qu'*in vivo*. Il est donc d'une grande importance de bien caractériser ces facteurs et leurs mécanismes, car ils apportent des informations importantes en biocompatibilité. Un bon approfondissement de ces facteurs et leurs mécanismes permettra de contrôler adéquatement l'expérimentation, du moins pour rendre l'étude reproductible et accessible. Il permettra également une extrapolation adéquate du véritable risque à la santé humaine lors de l'utilisation clinique des biomatériaux métalliques.

Facteurs physico-chimiques

Les caractéristiques des matériaux sont d'importance capitale en biocompatibilité et affectent la nature de l'interface tissu-implant (Galante et al., 1991). La réponse

cellulaire et l'incidence de la carcinogenèse sont influencées d'abord par la forme tridimensionnelle : géométrie (diamètre et sphéricité), texture (topographie, diamètre des aspérités, configuration de surface), porosité, adhérence, aire, préparation de l'implant (Amstutz et al., 1996). La porosité et les interstices peuvent accroître la croissance cellulaire et ainsi diminuer les descellements. Par contre, l'augmentation de l'aire peut aussi augmenter la corrosion et le relargage ionique du biomatériau (Galante et al., 1991; Bouchard et al., 1996; Lewis et Sunderman, 1996).

En cytotoxicité, la nature et le nombre de particules sont importants. Certains matériaux utilisés en trop grandes concentrations peuvent provoquer des réponses inflammatoires aiguës ne reflétant pas toujours les véritables conditions cliniques de relargage (Howie et al., 1996). La réponse cellulaire peut être aussi déterminée par la taille des particules (Howie et al., 1996); leur préparation et leur diamètre peuvent avoir un impact certain sur la tumorigénicité (Sunderman, 1989; Lewis et al., 1995). En ce sens, certains auteurs souhaitent l'établissement de méthodes normalisées de production et la caractérisation des particules pour faciliter la comparaison des résultats, autant pour les études *in vitro* qu'*in vivo*. On souhaite aussi l'utilisation de contrôles appropriés afin d'améliorer la comparaison de la réponse cellulaire (Howie et al., 1996).

La composition du biomatériau est un facteur important en biocompatibilité. Certains biomatériaux possèdent des composantes ayant une solubilité aqueuse, d'autres sont solubles uniquement dans des véhicules organiques (Amstutz et al., 1996). Effectivement, la solubilité et la stabilité sont des aspects importants à prendre en considération. De plus le milieu physiologique, étant un environnement aqueux et

oxygéné, peut influencer la corrosion de certains biomatériaux. Certains métaux ont cependant la propriété de se recouvrir d'une couche d'oxyde métallique produisant ainsi un film de passivation protecteur qui diminue le phénomène de corrosion. Ce film de passivation naturel, de quelques angströms d'épaisseur, est cependant fragile et peut se fissurer dans certaines circonstances. Dans des conditions dynamiques de mouvement ou de micromouvement, par exemple, cette couche protectrice peut subir des dommages, produisant des régions se corrodant préférentiellement : phénomène de « fretting corrosion » (Galante et al., 1991; Merritt et Brown, 1996; Ryhanen, 1999). Le processus de repassivation ou de reformation du film d'oxyde passif peut amener aussi une dissolution du métal ce qui l'associe à sa toxicité et particulièrement à sa carcinogénicité via sa génotoxicité. Le taux de repassivation varie d'un matériau à l'autre. Il semble plus lent pour des alliages de cobalt et de fer en comparaison avec les alliages à base de titane (Galante et al., 1991). Le taux de repassivation varie en fonction du pH et de la concentration en oxygène.

Les courants de polarisation anodique ou cathodique peuvent aussi avoir un impact sur les métaux, notamment lorsque certains matériaux spécifiques sont mis en présence. Les effets synergiques peuvent conditionner la corrosion dans l'organisme. Par exemple, le contact de deux matériaux via des solutions électrolytiques (comme dans les conditions physiologiques) peut ajouter une différence de potentiel dans le milieu. Il peut ainsi se produire un phénomène de corrosion galvanique : un matériau peut se dissoudre (anode) pendant que l'autre se passive (cathode). Cette différence de potentiel devient en effet une force pouvant catalyser la corrosion et la dissolution d'ions métalliques (Dube et Fisher, 1972; Merritt et Brown, 1996; Ryhanen, 1999; Wapner,

1991; Vahey et al., 1995). Évidemment le développement de traitements chimiques de surface aura un impact bénéfique sur les biomatériaux (Amstutz et al., 1996). Avec une diminution des processus de corrosion on imagine aussi une amélioration de la génocompatibilité.

Facteurs endogènes

Pharmacocinétique

Certaines notions de toxicocinétique sont aussi nécessaires à la compréhension de la toxicité et par conséquent de la cytogénotoxicité des biomatériaux. La pharmacocinétique représente l'étude quantitative et qualitative de la captation, l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'élimination des agents toxiques potentiellement présents parmi les composantes du biomatériau (Ecobichon, 1992). Ce sont tous des mécanismes importants car la toxicité peut aussi être modifiée de différentes façons par l'organisme.

Administration

Il existe des différences importantes de réactions d'un tissu à l'autre et donc d'un site d'implantation à un autre. La biocompatibilité du biomatériau peut différer en fonction de la voie d'implantation ou d'injection choisie: intramusculaire, intra-osseuse, sous-cutanée, etc. (Galante et al., 1991; Lewis et Sunderman, 1996; Howie et al., 1996). De même, il peut y avoir alors différentes susceptibilités à la carcinogénèse en relation avec le site choisi. Le véhicule utilisé peut aussi accélérer la solubilisation et ainsi promouvoir une dissolution préférentielle des particules métalliques (Lewis et al., 1995). La méthode d'implantation, la technique chirurgicale, la durée du traitement ainsi que la

méthode de stérilisation peuvent toutes certainement avoir des conséquences aussi sur la carcinogénicité (Merritt et Brown, 1996).

En effet, on sait qu'une lacune en stérilisation chimique peut causer une contamination potentielle. Un mauvais choix de technique peut amener des changements dans les propriétés physiques ou ajouter une source de produits résiduels. Ces derniers peuvent être métabolisés et former des produits adsorbés par le biomatériau induisant ainsi des changements inflammatoires. La stérilisation biologique, elle, amène à considérer qu'une réaction antigénique contre des pathogènes d'origine virale ou bactérienne peut se produire. Par conséquent, une stérilisation inappropriée peut être la source de réactivité anormale du tissu (Chvapil, 1981).

Absorption et distribution

Suite à une implantation, la distribution des composantes d'un biomatériau peut s'effectuer rapidement partout dans l'organisme. La distribution des particules ou des ions se fait grâce au flux sanguin à travers les organes, mais elle dépend aussi de la facilité avec laquelle les produits relargués traversent la barrière capillaire et la membrane cellulaire. En effet, les particules peuvent être transportées ainsi jusqu'à ce qu'elles frappent des barrières comme celles du cerveau (les composés liposolubles passent plus facilement), des yeux et du placenta. L'absorption à l'échelle cellulaire peut se produire de façons différentes : diffusion passive à travers la membrane, filtration à travers les pores membranaires, transport actif, diffusion facilitée et endocytose (Lu, 1991).

Excrétion

L'excrétion s'effectue après l'absorption et la distribution des composés toxiques. Sa vitesse est variable et les produits peuvent être excrétés tels quels, sous la forme de métabolites, ou sous la forme de conjugués. La principale route d'excrétion est l'urine. Cependant, le foie et les poumons représentent des organes excrétoires pour un bon nombre de composés. La route gastro-intestinale est aussi empruntée (Lu, 1991).

Biotransformation

La biotransformation est le mécanisme principal de détoxification de l'hôte. Il s'agit de convertir les produits en leurs métabolites ou leurs conjugués. Cependant il faut noter que certains métabolites sont plus toxiques que les composés originaux, conséquence de la bioactivation. Les mécanismes de biotransformation suivent deux phases. Les réactions de dégradation incluent les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Les réactions de conjugaison, elles, impliquent l'acétylation, la méthylation, la formation de glucuronide ainsi que les conjugaisons aux acides aminés, aux sulfates et au glutathion (Lu, 1991).

Le temps et l'âge

Dans des études expérimentales *in vivo*, il a été observé que le facteur temps était très important lors du choix de la durée d'implantation ou d'expérimentation. En carcinogénicité *in vivo*, on doit principalement se préoccuper de la période de latence. Cette dernière représente la période de temps qui s'écoule entre l'exposition à un matériau carcinogène et le développement d'un néoplasme (Cole et al., 1997). Chez l'humain, certains auteurs expliquent que la rareté des cas de carcinogénicité métallique

rapportés à la suite d'une implantation pourrait être due à une longue période de latence. Celle qui a été calculée grâce aux études industrielles démontre en moyenne 21 ans pour le chrome et 15 à 20 ans pour le nickel (Vahey et al., 1995; Wapner, 1991). Cependant, dans certains cas, des délais plus courts d'apparition de tumeurs suivant l'insertion de prothèses ont été rapportés par Coleman (1996). Ce dernier a, en effet, pu combiner les résultats de trois études rétrospectives de personnes ayant subi l'implantation d'une prothèse de hanche. On s'accorde pour dire que dix ans après l'implantation d'une prothèse semblable, le risque d'apparition d'une tumeur est plus élevé que dans la population en général (Coleman, 1996). En carcinogénicité, la durée de l'expérimentation est donc un facteur très important (Lewis et Sunderman, 1996) et cette longue période de latence chez l'humain rend difficile l'étude de l'évolution des tumeurs. Certains auteurs ont ainsi préféré étudier ce processus chez le rat. Il semble en effet que chez ce dernier la période de latence soit courte et en particulier pour les rats plus âgés (Pedley et al., 1981).

Il existe aussi une relation entre l'âge d'un individu et le développement de sa capacité à métaboliser les composés chimiques, mais elle n'est pas claire. Les jeunes animaux sont en général de 1,5 à 10 fois plus susceptibles que les adultes (Goldenthal, 1971). Cette plus grande susceptibilité générale des nouveaux-nés peut être attribuée à une différence du système de détoxification enzymatique. Il y a cependant une grande variété de susceptibilités et ce ne sont pas tous les produits chimiques qui sont plus toxiques chez le jeune. En cytogénotoxicité par contre, on s'accorde pour dire que la fréquence des aberrations chromosomiques croît avec l'âge de l'individu exposé (Tubiana et al., 1986).

Les changements des réponses toxiques circannuelles et circadiennes des drogues ont été démontrés. Ces changements de photopériodes peuvent donc aussi avoir un effet en biocompatibilité. On a observé en effet que l'altération de la photopériode de la souris était néfaste, on serait donc tenté de faire ici aussi un parallèle avec l'homme en spéculant une augmentation de la réponse toxique dans ces conditions (Sakellaris et al., 1975).

Alimentation

Le régime alimentaire peut aussi influencer sur la réponse à un agent toxique. Certains types de diètes peuvent altérer les études cliniques. La toxicité en soi peut, par exemple, résulter d'une déplétion en sources d'éléments essentiels ou chémoprotecteurs : magnésium, calcium, zinc tels que mentionnés précédemment. En laboratoire, on peut accorder généralement une attention spéciale au maintien d'une diète équilibrée. De temps en temps, elle peut être modifiée de façon à faciliter l'étude des différentes interactions chimiques. Les influences diététiques et en particulier l'incorporation de métaux essentiels peuvent donc altérer les réponses de toxicité. Elles devraient donc être considérées en biocompatibilité des matériaux.

Santé

La santé est aussi un facteur important. Chez certains patients, les causes majeures de changements tissulaires *in situ* peuvent être dues aux conditions pathologiques préexistantes plutôt qu'à l'implant: par exemple, la formation d'un néoplasme à la suite d'une fracture (Vahey et al., 1995). Les maladies rénales peuvent

aussi affecter les manifestations toxiques des biomatériaux; des déséquilibres des systèmes excrétoires et métaboliques du rein sont très influents. Les maladies cardiaques peuvent enfin augmenter la toxicité de ces produits chimiques en affectant la circulation rénale et hépatique (Lu, 1991).

Conditions de vie

Enfin, les conditions de travail sont à prendre en considération. Par exemple, des travailleurs de l'industrie exposés au nickel ont montré une augmentation des lacunes et d'autres anomalies chromosomiques dans les lymphocytes périphériques sanguins (Case et al., 1996). Le style de vie n'est pas non plus un facteur négligeable. La consommation d'alcool et le tabac peuvent influencer la réponse cytogénotoxique. On soupçonne la cigarette d'avoir une influence sur la biotransformation et la détoxification. Les drogues cytotoxiques utilisées en chimiothérapie, les gaz de combustion et de nombreux polluants chimiques peuvent avoir chacun leurs effets cytogénotoxiques. Le stress est un facteur qui pourrait avoir un effet sur la capacité du foie d'activer et de détoxifier les pro-carcinogènes.

Espèces

En toxicologie *in vitro*, il est à noter qu'il existe des différences de métabolisme et de susceptibilité d'une espèce à l'autre. En implantation, on a remarqué par exemple que les rats étaient plus susceptibles à l'induction de sarcomes que les lapins ou les chiens (Lewis et Sunderman, 1996). Il existe aussi des différences intra-espèces : on a remarqué entre autres des différences significatives de tumorigénèse pour certaines sous-espèces de rats (Lewis et Sunderman, 1996). Il existe aussi des variations individuelles

qui résultent des différents polymorphismes présents dans la population. Certains prédisposent d'une résistance plus forte et d'autres, d'une susceptibilité plus forte à la toxicité de certains composants des biomatériaux (Lu, 1991). En culture de cellules, le même biomatériau peut produire des réactions différentes en relation avec la lignée cellulaire utilisée (Pedley et al., 1981; Lewis et Sunderman, 1996; Howie et al., 1996).

Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux sont nombreux. On reconnaît depuis longtemps l'effet de la température sur la toxicité en expérimentation animale. Elle semble avoir un effet sur la sévérité et la durée de la réponse. Certaines réactions biochimiques ont besoin d'une température adéquate pour la biotransformation des métaux. La pression barométrique est également à considérer. À différentes altitudes, certains produits chimiques sont plus toxiques que d'autres. Certains chercheurs spéculent que ces effets sont causés plus précisément par des altérations de la tension d'oxygène (Lu, 1991). Les manipulations ou les erreurs de mesures techniques et d'évaluation des résultats (Lewis et Sunderman, 1996) aussi doivent être prises en compte. Dans le cas des méthodes qualitatives, il peut y avoir des différences inter-observateurs et même intra-observateurs au cours des expériences.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET DÉVELOPPEMENTS FUTURS

Dans cette étude, l'application principale de l'essai de génotoxicité EM-ISEL, à titre de test de biocompatibilité, a permis d'évaluer le potentiel génotoxique du nickel-titane (un biomatériau potentiel), du titane pur, du nickel pur et de l'acier inoxydable. Cette technique d'immunocytochimie à l'or colloïdal a en effet permis la localisation et

la quantification des dommages simple-brin induits à l'ADN par les ions métalliques en culture de cellules. Dans cet essai, les cassures étaient représentées par la distribution macromoléculaire des particules d'or, comptabilisées grâce au programme "NIH Image". Le titane, un biomatériau métallique couramment utilisé en chirurgie et reconnu pour sa biocompatibilité, a constitué un excellent moyen d'établir une comparaison dans le cadre de ces essais. Il a permis d'établir une relative génocompatibilité du nickel-titane, avec lequel la réponse cellulaire s'est avérée satisfaisante. En effet, les résultats obtenus avec le NiTi sont très prometteurs, puisque nous n'avons pas observé de différences significatives avec le titane pur en ce qui a trait au nombre de cassures simple-brin occasionnés à l'ADN, qu'elles soient de type métaphasique ou interphasique. En présence de nickel pur, nous avons remarqué que la prolifération cellulaire était faible (très peu de métaphases) et que le nickel était tout simplement cytotoxique et génotoxique. Dans les mêmes conditions, les noyaux se sont avérés surtout apoptotiques (ou nécrotiques).

Le nickel-titane donne donc des résultats comparables à ceux du titane pur et montre une génotoxicité beaucoup plus faible que celle observée avec le Ni pur. Par contre, l'acier inoxydable 316-L produit des dommages plus importants à la chromatine que le nickel-titane. La génotoxicité du 316-L SS se rapproche même de celle du Ni pur dans certains cas. En présence de ces deux types de poudres, il n'y a pas de différences significatives en terme de bris simple-brin d'ADN et ce, si l'on observe la chromatine interphasique. Pour expliquer cette relative génotoxicité de l'acier inoxydable, on suppose que sa composition même soit en cause. En effet, le 316-L SS contient du nickel (10-14%) et du chrome (16-18%): deux d'éléments génotoxiques susceptibles de

diffuser dans le milieu semi-physiologique. Grâce aux essais de spectroscopie par absorption atomique, on a pu constater qu'au moins trois fois plus d'atomes de nickel parvenaient à diffuser à partir de poudres d'acier inoxydable qu'à partir de NiTi. Ainsi, on suppose l'existence de liens covalents très forts entre les atomes titane et nickel dans cet état intermétallique que représente le nickel-titane équiatomique (Van Humbeeck, 1998). On croit aussi que l'oxyde de titane biocompatible qui se forme à la surface de ce dernier puisse représenter une barrière efficace à la dissolution de nickel. D'après Wever et al. (1998), on peut même compter sur une couche supplémentaire de phosphate de calcium pour prévenir la diffusion d'ions nickel. Cela expliquerait sûrement pourquoi le NiTi semble aussi stable tout en étant moins susceptible à la corrosion que l'acier inoxydable (Duerig et al., 1997).

On a aussi observé que le nickel se dissout en général plus facilement que le titane. Il faudra éventuellement étudier comment se comportent d'autres types d'ions métalliques en solution. Le chrome est un bon exemple d'autant plus qu'il fait partie de la composition du 316-L SS. Afin d'établir un véritable lien entre la dynamique de dissolution et la génotoxicité en conditions semi-physiologiques, on pourra ainsi poursuivre des études physicochimiques sur les facteurs qui influencent la vitesse de dissolution de différents ions impliqués.

Enfin, dans ce travail nous avons choisi de travailler avec des poudres de métal pour tenter de reproduire la dissolution ionique en milieu semi-physiologique. Cependant, si l'on souhaite étudier la mécanique moléculaire de la carcinogénicité et l'action spécifique des ions, il vaudrait mieux, dans ce cas, d'utiliser des sels métalliques.

Cela facilitera le calcul des concentrations et on pourra alors effectuer des courbes dose-réponses à titre de comparaison avec d'autres types d'essais de génotoxicité. Il y en a déjà quelques uns de normalisés par l'ISO: l'augmentation des échanges de chromatides-soeurs, l'essai du micronoyaux, la synthèse d'ADN non programmée. Tous seraient réalisables dans des conditions semi-physiologiques semblables (ISO, 1992b).

Pour les essais en présence de dispositifs médicaux, on pourra appliquer différents traitements de surface afin d'améliorer la biocompatibilité. Les traitements mécaniques, électrochimiques et thermiques constituent des moyens possibles de limiter la dissolution ionique des dispositifs en nickel-titane. Des techniques de stérilisation (qu'elles soient de type biologique ou chimique), sont des façons d'améliorer la biocompatibilité du nickel-titane. Des études de corrosion et des dosages du milieu avec de tests d'absorption atomique pourront être réalisés bien sûr en parallèle avec d'autres tests de biocompatibilité pour vérifier l'efficacité des traitements.

Quoi qu'il en soit, la structure et la stabilité du nickel-titane, ainsi que les films passifs de surface semblent être des acteurs potentiels efficaces dans cette biocompatibilité du nickel-titane. Ces dernières hypothèses et les résultats de ce travail ne permettent pas de conclure à une biocompatibilité parfaite et définitive du nickel-titane. Cependant, ils sont fort encourageants pour l'approbation éventuelle du nickel-titane à titre d'implant chirurgical permanent. Quant à l'essai *in situ* end-labeling en microscopie électronique pour la présélection des biomatériaux métalliques, il semble avoir un avenir prometteur.

BIBLIOGRAPHIE

Abalea, V., J. Cillard, M.P. Dubos, J.P. Angers, P. Cillar, I. Morel. Iron-induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture. *Carcinogenesis* 19: 1053-1059, 1998.

American Standards for Testing and Materials (ASTM). Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. F813-83. Dans : Annual Book of ASTM Standards. ASTM, Philadelphie, PA, USA, 13: 277-280, 1991.

American Standards for Testing and Materials (ASTM). Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity. F895-84. Dans : Annual Book of ASTM Standards. ASTM, Philadelphie, PA, USA, 13: 291-294, 1991b.

Amstad, P.A., H. Liu, M. Ichimiva, I.K. Berezsky, B.F. Trump. Manganese superoxide dismutase expression inhibits soft agar growth in JB6 clone41 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis* 18: 479-484, 1997.

Amstutz, H.C., P. Campbell, H. McKellop, T.P. Schmalzried, W.J. Gillespie, D. Howie, J. Jacobs, J. Medley, K. Merritt. Metal on Metal Total Hip Replacement Workshop Consensus Document. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 329S: S297-S303, 1996.

Anard, D., M. Kirsh-Volders, A. Elhajouji, K. Belpaeme, D. Lison. In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis* 18: 177-84, 1997.

Andreasen, G.F., T.B. Hilleman, An evaluation of 55-cobalt substituted Nitinol wire for use in orthodontics. *J. Am. Dent. Assoc.* 82: 1373-1375, 1971.

Ansari, B., P.J. Coates, B.D. Greenstein, P.A. Hall. *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J. Pathol.* 170: 1-8, 1993.

Armitage, D.A., D.M. Grant, T.L. Parker, K.G. Parker. Haemocompatibility of surface modified NiTi. Dans: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*. A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.401-406, 1997.

Assad, M., E.A. DesRosiers, L'H. Yahia, C.H. Rivard. Cytocompatibility testing of the Shape-Memory Nickel-Titanium (NiTi) Alloy. Dans: *Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Society For Biomaterials in conjunction with the 26th International Biomaterials Symposium*, Boston, MA, USA, p. 297, 1994.

Assad, M., L'H. Yahia, E.A. DesRosiers, S. Lombardi, C.H. Rivard. Cyto-compatibility testing of Nickel-Titanium. Dans: *Shape Memory and Superelastic Technologies*, A.

Pelton, D. Hodgson, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.215-220, 1995.

Assad, M., N. Lemieux, C.H. Rivard. Immunogold Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL) Assay for Biomaterial DNA Damage Detection. *Biomed. Mater. Eng.* 7: 391-400, 1997.

Assad, M., L'H. Yahia, C.H. Rivard, N. Lemieux. *In Vitro* Biocompatibility Assessment of a Nickel-Titanium Alloy using Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL). *J. Biomed. Mater. Res.* 41: 154-161, 1998.

Assad, M., L'H. Yahia, N. Lemieux, C.H. Rivard. Comparative *In Vitro* Biocompatibility of Nickel-Titanium, Pure Nickel, Pure Titanium, and Stainless Steel: Genotoxicity and Atomic Absorption Evaluation. *Biomed. Mater. Eng.* 9: 1-12, 1999.

Ayers R.A., S.J. Simske, T.A. Bateman, A. Petkus, R.L.C. Sachdeva, V.E. Gyunter. Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks. *J. Biomed. Mater. Res.* 45: 42-47, 1999.

Bal, W., J. Lukszo, K.S. Kasprzak. Mediation of oxidative DNA damage by nickel(II) and copper(II) complexes with the N-terminal sequence of human protamine HP2. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 915-21, 1997.

Barrett, R.D., S.E. Bishara, J.K. Quinn. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium *in vitro*. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop. 103: 8-14, 1993.

Berger-Gorbet, M., B. Broxup, C.H. Rivard, L'H. Yahia. Biocompatibility testing of NiTi screws using immunohistochemistry on sections containing metallic implants. J. Biomed. Mater. Res. 32: 243-248, 1996.

Bernadette, R., R. Gochuico, M.C. Williams, A. Fine. Simultaneous *in situ* hybridization and TUNEL to identify cells undergoing apoptosis. Histochem. J. 29: 413-418, 1997.

Betz, P., A. Nerlich, J. Tubel, I. Wiest, R. Hausmann. Detection of cell death in human skin wounds of various ages by an *in situ* end labeling of nuclear DNA fragments. Int. J. Legal Med. 110: 240-243, 1997.

Beyersmann, D. The significance of interactions in metal essentiality and toxicity. Dans: Metals and their compounds in the environment. E. Merain, Éditeur, VCH Weinheim, Berlin, Allemagne, pp. 491-509, 1991.

Beyersmann, D., A. Hartwig. Genotoxic Effects of Metals Compounds. Arch. Toxicol. 16: 192-198, 1993.

Bialkowski, K., K.S. Kasprzak. A novel assay of 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase) activity in cultured cells and its

use for evaluation of cadmium(II) inhibition of this activity. *Nucleic Acids Res.* 26: 3194-3201, 1998.

Bishara, S.E., R.D. Barrett, M.I. Selim. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 103: 115-119, 1993.

Bishayee, A., M. Chatterjee. Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *Br. J. Cancer.* 71: 1214-1220, 1995.

Bishayee, A., R. Karmakar, A. Mandal, S.N. Kundu, M. Chatterjee. Vanadium-mediated chemoprotection against chemical hepatocarcinogenesis in rats: haematological and histological characteristics. *Eur. J. Cancer Prev.* 6: 58-70, 1997.

Bordji, K., J.Y. Jouzeau, D. Mainard, E. Payan, P. Netter, K.T. Rie, T. Stucky, M. Hage-Ali. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials* 17: 929-940, 1996.

Bouchard, P.R., J. Black, B.A. Albrecht, R.E. Kaderly, J.O. Galante. Carcinogenicity of CoCrMo (F-75) implants in the rat. *J. Biomed. Mater. Res.* 32: 37-44, 1996.

Brunborg, G., J.A. Holme, J.K. Hongslo. Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells. *Mutat. Res.* 342: 157-170, 1995.

Buehler, W.J., J.V. Gilfrick, R.C. Wiley. Effects of low temperature phase changes on the mechanical properties of alloys near composition TiNi. *J. Appl. Phys.* 34: 1475-1477, 1963.

Buehler, W.J., F.E. Wang. A summary of Recent Research on the Nitinol Alloys and Their Potential Applications in Ocean Engineering. *Ocean Eng.* 1: 105-120, 1968.

Carvalho, G.S., I. Bravo. *In vitro* immuno-cytotoxicity of iron evaluated by DNA synthesis of human T lymphocytes stimulated via CD2 and CD3. *J. Mat. Sc. Mater. Med.* 4: 366-371, 1993.

Case, C.P., V.G. Langkamer, R.T. Howell, J. Webb, G. Standen, M. Palmer, A. Kemp, I.D. Learmonth. Preliminary observations on possible premalignant changes in bone marrow adjacent to worn total hip arthroplasty implants. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 329S: S269-279, 1996.

Castleman, L.S., S.M. Motzkin, F.P. Alicandri, V.L. Bonawit, A.A. Johnson. Biocompatibility of Nitinol Alloy as an Implant Material. *J. Biomed. Mater. Res.* 10: 695-731, 1976.

Chang, R.T., T.H. Campbell, M.O. Bloem. Intracoronary Ni-Ti stent implantation in the porcine animal model. Dans: *Proceedings of the Second International Conference on*

Shape Memory and Superelastic Technologies. A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.579-584, 1997.

Chen G., X. Wen, N. Zhang. Corrosion resistance and ion dissolution of titanium with different surface microroughness. *Biomed. Mater. Eng.* 8: 61-74, 1998.

Chen, J., K. Jin, M. Chen, W. Pei, K. Kawaguchi, D.A. Greenberg, R.P. Simon. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J. Neurochem.* 69: 232-245, 1997.

Christie, N.T. The synergistic interaction of nickel(II) with DNA damaging agents. *Toxicol. Environ. Chem.* 22: 51-59, 1989.

Chvapil, M. The fate of natural tissue prostheses. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Vol. I., D.F. Williams, Éditeur, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.87-104, 1981.

Ciapetti, G., E. Cenni, L. Pratelli, A. Pizzoferrato. *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 14: 359-364, 1993.

Civjan, S., E.F. Huget, L.B. DeSimon. Potential Applications of Certain Nickel-Titanium (Nitinol) Alloys. *J. Dent. Res.* 54: 89-96, 1975.

Coates, P.J., V. Save, B. Ansari, P.A. Hall. Demonstration of DNA damage/repair in individual cells using *in situ* end labelling: association of p53 with sites of DNA damage. *J. Pathol.* 176: 19-26, 1995.

Cohen, M., D. Latta, T. Coogan, M. Costa. Mechanisms of metal carcinogenesis: the reactions of metals with nucleic acids. Dans: *Biological effects of heavy metals*. Vol. II, E.C. Foulkes, Éditeur, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 19-75, 1991.

Cole, B.J., E. Schultz, T.F. Smilari, S.I. Hadju, E.S. Krauss. Malignant fibrous histiocytoma at the site of a total hip replacement: review of the literature and case report. *Skeletal Radiol.* 26: 559-563, 1997.

Coleman, M.P. Cancer risk from orthopedic prostheses. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 26: 139-146, 1996.

Cutright, D.E., S.N. Bhaskar, B. Perez, R.M. Johnson, G.S.M. Cowan. Tissue reaction to nitinol wire alloy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 35: 578-584, 1973.

Dally, H., A. Hartwig. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 18: 1021-1026, 1997.

Daniel, L.N., Y. Mao, T.C. Wang, C.J. Markey, S.P. Markey, X. Shi, U. Saffioti. DNA strand breakage, thymine glycol production, and hydroxyl radical generation induced by different samples of crystalline silica *in vitro*. *Environ. Res.* 71: 60-73, 1995.

deFazio, A., J.A. Leary, D.W. Hedley, M.N.H. Tattersall. Immunohistochemical detection of proliferation cells *in vivo*. J. Histochem. Cytochem. 35: 571-577, 1987.

Denizot, F., R. Lang. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods 8: 271-277, 1986.

Didenko, V.V., P.J. Hornsby. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. J. Cell Biol. 135: 1369-1376, 1996.

Doran, A., F.C. Law, M.J. Allen, N. Rushton. Neoplastic transformation of cells by soluble but not particulate forms of metals used in orthopaedic implants. Biomaterials 19: 751-759, 1998.

Drachenberg, C.B., O.B. Ioffe, J.C. Papadimitriou. Progressive increase of apoptosis in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. Arch. Pathol. Lab. Med. 121: 54-58, 1997.

Dube, V.E., D.E. Fisher. Hemangioendothelioma of the leg following metallic fixation of the tibia. Cancer 30: 1260-1266, 1972.

Duerig, T.W., A.R. Pelton, D. Stockel. Superelastic Nitinol for Medical Devices. *Med. Plastics Biomater.* 4: 30-43, 1997.

Dunnick, J.K., M.R. Elwell, A.E. Radovsky, J.M. Benson, F.F. Hahn, K.J. Nikula, E.B. Barr, C.H. Hobbs. Comparative Carcinogenic Effects of Nickel Subsulfides, Nickel Oxide, or Nickel Sulfate Hexahydrate Chronic Exposures in the Lung. *Cancer Res.* 55: 5251-5256, 1995.

Dutta, R.S., K. Madangopal, H.S. Gadiyar, S. Banerjee. Biocompatibility of a Ni-Ti shape memory alloy. *British Corrosion J.* 28: 217-221, 1993.

Ecobichon, D. (Éditeur). *The basis of toxicity testing.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992.

Eddie, J.W., G.F. Andreason, M.P. Zaytoun. Surface Corrosion of Nitinol and Stainless Steel Under Clinical Conditions. *Angle Orthod.* 51: 319-324, 1981.

Edwards, A.J., E.Y. Moon, D. Anderson, D.B. McGregor. The effect of simultaneous exposure to bromodeoxyuridine and methyl methane sulfonate on sister-chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 289: 139-144, 1993.

Eldridge, S.R., L.F. Tilbury, T.L. Goldsworthy, B.E. Butterworth. Measurement of chemically induced cell proliferation in rodent liver and kidney: a comparison of 5-

bromo-2'-deoxyuridine and [³H]thymidine administered by injection or osmotic pump. *Carcinogenesis* 11: 2245-2251, 1990.

Endo, K., R. Sachdeva, Y. Araki, H. Ohno. Effects of Titanium Nitride Coatings on Surface and Corrosion Characteristics of Ni-Ti Alloy. *Dent. Mater. J.* 13: 228-239, 1994.

Evans, E.J. Cell damage *in vitro* following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy. *Biomaterials* 15: 713-717, 1994.

Fernandez, J.L., J. Gosalvez, V.J. Goyanes. Detection of DNA strand breaks induced by hydroxyl radicals in nuclear and chromosomal chromatin by electron microscopy. *Cytobios* 73: 189-195, 1993.

Fernandez, J.L., A. Campos, C. Lopez-Fernandez, J. Gosalvez, V.J. Goyanes. Difference in constitutive heterochromatin behaviour between human amniocytes and lymphocytes detected by sequential *in situ* exonuclease III digestion-random primer extension procedure. *J. Med. Genet.* 32: 32-35, 1995.

Fetni, R., R. Drouin, N. Lemieux, P.E. Messier, C.L. Richer. Simultaneous visualization of chromosome bands and hybridization signal using colloidal-gold labeling in electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10916-10920, 1991.

Fleury, J.M., P. Degen. Apoptose: le suicide des cellules enfin compris. *Québec Sciences/Mars* 1996: 35-39, 1996.

Floyd, M. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11: 1447-1450, 1990.

Fujita, K., H. Ohyama, T. Yamada. Quantitative comparison of *in situ* methods for detecting apoptosis induced by X-ray irradiation in mouse thymus. *Histochem. J.* 29: 823-830, 1997.

Gaffney, E.F., A.J. O'Neill, M.J. Staunton. In situ end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 48: 1017-1021, 1995.

Galante, J.O., J. Lemons, M. Spector, P.D. Jr. Wilson, T.M. Wright. The biologic effects of implant materials. *J. Orthop. Res.* 9: 760-775, 1991.

Gardner, E.D., M.J. Simmons, D.P. Snustad (Éditeurs). *Principles of Genetics*. Wiley, New York, NY, USA, pp.91-129, 1991.

Gillespie, W.J., D.A. Henry, D.L. O'Connell, S. Kendrick, E. Juszczak, K. McInneny, L. Derby. Development of Hematopoietic Cancers After Implantation of Total Joint Replacement. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 329S: S290-S296, 1996.

Gingras, D., M. Bendayan. Colloidal Gold Electron Microscopic *In Situ* Hybridization: Combination with Immunocytochemistry for the Study of Insulin and Amylase Secretion. *Cell Vision* 2: 218-224, 1995.

Goldenthal, E.I. A compilation of LD₅₀ values in newborn and adult animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18: 185-207, 1971.

Gosalvez, J., C. Lopez-Fernandez, J.L. Fernandez, V. Goyanes. Oligonucleotide priming in situ to detect induced DNA breaks under electron microscopy. *Trends. Genet.* 9: 156-157, 1993.

Gosalvez, J., C. Lopez-Fernandez, C. Garcia de la Vega, R. Mezzanotte, J.L. Fernandez, V. Goyanes. Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease. *Genome* 36: 230-234, 1993b.

Gotman I. Characteristics of metals used in implants. *J. Endourol.* 11: 383-389, 1997.

Granchi, D., E. Verri, G. Ciapetti, L. Savarino, E. Cenni, A. Gori, A. Pizzoferrato. Effects of chromium extracts on cytokine release by mononuclear cells. *Biomaterials* 19 : 283-291, 1998.

Guess, W.L., A. Rosenbluth, B. Schmidt, J. Autian. Agar Diffusion Method for Toxicity Screening of Plastics on Cultures Cell Monolayers. *J. Pharm. Sc.* 54: 1545-1547, 1965.

Guille, E., J. Grisvard, I. Sissoeff. Structure and Function of Metallo-DNA in the Living Cell. Dans: Systemic Aspects of Biocompatibility. Vol. II, D.F. Williams, Éditeur, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 33-85, 1981.

Haaf, T., M. Dominguez-Steglich, M. Schmid. Immuno-cytogenetics VI. A non histone antigen is cell type-specific associated with constitutive heterochromatin and reveals condensation centers in metaphase chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 50: 141-144, 1989.

Hanas, J.S., C.G. Gunn. Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions. *Nucleic Acids Res.* 24: 924-930, 1996.

Hartmann, M., A. Hartwig. Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 19: 617-21, 1998.

Hartwig, A., R. Schlepegrell, D. Beyersmann. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 241: 75-82, 1990.

Hartwig, A., R. Schlepegrell, D. Beyersmann. Interactions in nickel mutagenicity: Indirect mechanisms in genotoxicity and interference with DNA repair. Dans: *Metal Compounds in Environment and Life* 4. E. Merian, W. Haerdi, Éditeurs, Science Reviews, Wilmington, pp. 475-480, 1991.

Hartwig, A., L.H.F. Mullenders, R. Schlepegrell, U. Kasten, D. Beyersmann. Nickel(II) Interferes with the Incision Step in Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Cancer Res.* 54: 4045-4051, 1994.

Hartwig, A., I. Kruger, D. Beyersmann. Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. *Toxicol. Lett.* 72: 353-358, 1994b.

Hartwig, A. Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals* 8: 3-11, 1995.

Hawkins, N.J., J. Lees, R.L. Ward. Detection of apoptosis in colorectal carcinoma by light microscopy and *in situ* end labelling. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 19: 227-232, 1997.

Hayashi, R., Y. Ito, K. Matsumoto, Y. Fujino, Y. Otsuki. Quantitative differentiation of both free 3'-OH and 5'-OH DNA ends between heat-induced apoptosis and necrosis. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 1051-1059, 1998.

Head, W.C., D.J. Bauk, R.H. Jr. Emerson. Titanium As the Material of Choice for Cementless Femoral Components in Total Hip Arthroplasty. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 311: 85-90, 1995.

Hempowitz, H., F.G. Sander, A. Wichelhaus, R.P. Franke, J. Edrich. Nonlinear finite element calculations of orthodontic archwires made of superelastic NiTi-alloys. Dans:

Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies. A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.491-496, 1997.

Hempowitz, H., F.G. Sander, A. Wichelhaus, R.P. Franke, J. Edrich. Heat treatment of NiTi-archwires, simulated with nonlinear coupled finite element analysis. Dans: Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies. A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.497-501, 1997.

Hong, Y.C., S.R. Paik, H.J. Lee, K.H. Lee, S.M. Jang. Magnesium inhibits nickel-induced genotoxicity and formation of reactive oxygen. Environ. Health Perspect. 105: 744-748, 1997.

Howie, D.W., S.D. Rogers, M.A. McGee, D.R. Haynes. Biologic Effects of Cobalt Chrome in Cell and Animal Models. Clin. Orthop. Rel. Res. 329S : S217-S232, 1996.

Huang N., Y.R. Chen, J.M. Luo, J. Yi, R. Lu, J. Xiao, Z.N. Xue, X.H. Liu. In vitro investigation of blood compatibility of Ti with oxide layers of rutile structure. J. Biomater. Appl. 8: 404-412, 1994.

Ilyin, A.A., P.G. Sysolyatin, V.E. Gunter, A.P. Dergilev, M.A. Didin, S.P. Sysolyatin, I.A. Makarova. The use of superelastic shape memory implants in temporo-mandibular

joint surgery. Dans: Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB), Montréal, Canada, p.177, 1997.

Inoki, C., H. Yamashita, K. Ueki, K. Kumagai, Y. Fukuda, E. Ninomiya, K. Nakamura, R. Hayashi, M. Ueki, Y. Otsuki. Image analysis and ultrastructural detection of DNA strand breaks in human endometrium by in situ end-labeling techniques. J. Histotech. 20: 321-328, 1997.

International Organization for Standardization (ISO). Biological evaluation of medical devices - #10993-2: Animal welfare requirements, ISO, Genève, Suisse, pp.1-5, 1992.

International Organization for Standardization (ISO). Biological evaluation of medical devices - #10993-3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity, ISO, Genève, Suisse, pp. 1-8, 1992b.

International Organization for Standardization (ISO). Biological evaluation of medical devices - #10993-5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, ISO, Genève, Suisse, pp. 1-7, 1992c.

International Organization for Standardization (ISO). Biological evaluation of medical devices - #10993-6: Tests for local effects after implantation, ISO, Genève, Suisse, p.9, 1994.

International Organization for Standardization (ISO). Biological evaluation of medical devices - #10993-12: Sample preparation and reference materials, ISO, Genève, Suisse, pp.1-11, 1996.

Jacobs, J.J., A.K. Skipor, P.F. Doorn, P. Campbell, T.P. Schmalzried, J. Black, H.C. Amstutz. Cobalt and Chromium Concentrations With Metal on Metal Total Hip Replacements. Clin. Orthop. Rel. Res. 329S: S256-S263, 1996.

Johnson, A.A., F.P. Alicandri. Thermoconstrictive Surgical Appliance. U.S. Patent No. 3,786,806, January 2, 1974.

Judde, J.G., F. Breillout, C. Clemenceau, M.F. Poupon, C. Jasmin. Inhibition of rat natural killer cell function by carcinogenic nickel compounds: preventive action of manganese. J. Natl. Cancer Inst. 78: 1185-1190, 1987.

Kanematu N., K.I. Shibata, S. Kurenuma, K. Watanabe, A. Yamagami, Y. Nishio, T. Fujii. Gifu Shika Gakkai Zasshi 17: 583-591, 1990.

Kasprzak, K.S. Possible Role of Oxidative Damage in Metal-Induced Carcinogenesis. Cancer Investigation 13: 411-430, 1995.

Kasprzak, K.S., P. Jaruga, T.H. Zastawny, S.L. North, C.W. Riggs, R. Olinski, M. Dizdaroglu. Oxidative DNA base damage and its repair in kidneys and livers of nickel(II)-treated male F344 rats. Carcinogenesis 18: 271-277, 1997.

Kawabata, T., Y. Ma, I. Yamador, S. Okada. Iron-induced apoptosis in mouse renal proximal tubules after an injection of a renal carcinogen, iron-nitritotriacetate. *Carcinogenesis* 18: 1389-1394, 1997.

Ketabchi, A., A. MacRobert, P.M. Speight, J.H. Bennett. Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human keratinocytes. *Arch. Oral Biol.* 43: 143-9, 1998.

Kim H., J.W. Johnson. Corrosion of stainless steel, nickel-titanium, coated nickel-titanium, and titanium orthodontic wires. *Angle Orthod.* 69: 39-44, 1999.

Klein, C.B., K. Frenkel, M. Costa. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 592-604, 1991.

Koizumi, T., K. Tajima, N. Emi, A. Hara, K.T. Suzuki. Suppressive effect of molybdenum on hepatotoxicity of N-nitrosodiethylamine in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 460-462, 1995.

Kressel, M., P. Groscurth. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 278: 549-56, 1994.

Kumar, R., S. Sukumar, M. Barbacid. Activation of *ras* oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 248: 1101-1104, 1990.

Kuo, P.P.F., P.J. Yang, Y.F. Zhang, H.B. Yang, Y.F. Yu, K.R. Dai, W.Q. Hong, M.Z. Ke, T.D. Cai, J.C. Tao. The Use of Nickel-Titanium Alloy in Orthopedic Surgery in China. *Orthopedics* 12: 111-116, 1989.

Landorff, J.R. Neoplastic transformation of mammalian cells by carcinogenic metal compounds: cellular and molecular mechanisms. Dans: *Biological Effects of Heavy Metals*. Vol. II, E. Foulkes, Éditeur, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.1-18, 1990.

Lemieux, N., R. Drouin, C.L. Richer. High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Hum. Genet.* 85: 261-266, 1990.

Levenets, A.A., M.A. Zvigintsev, S.I. Starosvetsky, V.M. Semenyuk, A.I. Pozdeev, V.E. Gjunter. Dental implantation of perspicacious NiTi endoprosthesis in diabetes mellitus. Dans: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montréal, Canada, p. 179, 1997.

Lewis, C.G., R.M. Belniak, M.C. Plowman, S.M. Hopper, J.A. Knight, F.W. Sunderman. Intraarticular carcinogenesis bioassays of CoCrMo and TiAlV alloys in rats. *J. Arthroplasty* 10: 75-82, 1995.

Lewis, C.G., F.W. Sunderman. Metal carcinogenesis in total joint arthroplasty. Animal models. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 329S: S264-268, 1996.

Lincks J., B.D. Boyan, C.R. Blanchard, C.H. Lohmann, Y. Liu, D.L. Cochran, D.D. Dean, Z. Schwartz. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19: 19-32, 1998.

Lloyd, D.R., P.L. Carmichael, D.H. Philips. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 420-427, 1998.

Loeb, L.A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 51: 3075-3079, 1991.

Lombardi, S., L'H. Yahia, J.E. Klemberg-Sapieha, D.L. Piron, A. Selmani, C.H. Rivard, G. Drouin. Improvement in Corrosion Resistance of Ni-Ti Shape Memory Alloy by Plasma Surface Modification. Dans: *Proceedings of the First Shape Memory and Superelastic Technologies*. A. Pelton, D. Hodgson, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.221-226, 1995.

Lu, F.C., (Éditeur). *Basic toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment*. Hemisphere Publishing Co., New York, NY, USA, 1991.

Lucassen, P.J., W.C. Chung, W. Kamphorst, D.F. Swaab. DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ end labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer disease in the absence of apoptotic morphology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56: 887-90, 1997.

Majno, G., I. Joris. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis: An overview of Cell Death. Am. J. Pathol. 146: 3-15, 1995.

Manning, F.C.R., J. Xu, S.R. Patierno. Transcriptional Inhibition by Carcinogenic Chromate: Relationship to DNA Damage. Mol. Carcinog. 6: 270-279, 1992.

Matsumoto, K., N. Tajima, S. Kuwahara. Correction of Scoliosis with Shape-memory Alloy. J. Jpn. Orthop. Assoc. 67: 267-274, 1993.

Merritt, K., S.A. Brown. Release of hexavalent chromium from corrosion of stainless steel and cobalt-chromium alloys. J. Biomed. Mater. Res. 29: 627-633, 1995.

Merritt, K., S.A. Brown. Distribution of Cobalt Chromium Wear and Corrosion Products and Biologic Reactions. Clin. Orthop. Rel. Res. 329S: S233-S243, 1996.

Messier, P.E., P. Jean, C.L. Richer. Easy transfer of selected mitoses from light to electron microscopy. Cytogenet. Cell Genet. 43: 207-210, 1986.

Migheli, A., P. Cavalla, S. Marino, D. Schiffer. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissues after *in situ* end-labeling of DNA strand breaks. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53: 606-616, 1994.

Migheli, A., A. Attanasio, D. Schiffer. Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by *in situ* end-labelling techniques. J. Pathol. 176: 27-35, 1995.

Mirgazizov, M.Z., R.G. Hafizov, G.T. Saleeva, R.A. Saleev, A.M. Mirgazizov. Dental mechanoactive implants with the effect shape memory. Dans: Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB), Montréal, Canada, p.182, 1997.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Method. 65: 55-63, 1983.

Mundle, S.D., X.Z. Gao, S. Khani, S.A. Gregory, H.D. Preisler, A. Raza. Two *in situ* labeling techniques reveal different patterns of DNA fragmentation during spontaneous apoptosis *in vivo* and induced apoptosis *in vitro*. Anticancer Res. 15: 1895-1904, 1995.

Mundle, S.D., A. Raza. The two *in situ* techniques do not differentiate between apoptosis and necrosis but rather reveal distinct patterns of DNA fragmentation in apoptosis. Laboratory Investigation 72: 611-612, 1995b.

Nakadaira, H., K. Endoh, M. Yamamoto, K. Katob. Distribution of selenium and molybdenum and cancer mortality in Niigata, Japan. Arch Environ. Health. 50: 374-380, 1995.

Nonclercq, D., D. Reverse, G. Toubeau, G. Laurent, J. Zanen, J.A. Heuson-Steinnon. *In situ* demonstration of apoptotic germ cells in an experimental model of chemical castration. *Biochemica* 1: 12-15, 1997.

Nose, K., H. Okamoto. Detection of Carcinogen-Induced DNA breaks by Nick Translation in Permeable Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 383-389, 1983.

Oonishi, H., E. Tsuji, M. Miyaga, T. Hamada, Y. Suzuki, T. Nabeshima, T. Hamaguchi, N. Okabe. Biological reaction of Ni in TiNi shape memory alloy. Dans: 2nd World Congress on Biomaterials, combined with the 10th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Washington, D.C., USA, p.183, 1984.

Oshida, Y., S. Miyazaki. Corrosion and biocompatibility of shape memory alloys. *Corrosion Eng.* 40: 1009-1025, 1991.

Patierno, S.R., M. Sugiyama, J.P. Basilion, M. Costa. Preferential DNA-protein crosslinking by NiCl₂ in magnesium-insoluble regions of fractionated Chinese hamster ovary cell chromatin. *Cancer Res.* 45: 5787-5794, 1985.

Pedley, R.B., G. Meachim, D.F. Williams. Tumor induction by implant materials. Dans: *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Vol. II, D.F. Williams, Éditeur, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.175-202, 1981.

Porter, D.W., H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi, M.J. Jr. Fivash, K.S. Kasprzak. Sensitivity of *Escherichia coli* (MutT) and human (MTH1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II) and cadmium(II). *Carcinogenesis* 18: 1785-1791, 1997.

Putters, J.L.M., D.M.K.S. Kaulesar Sukul, G.R. de Zeeuw, A. Bijma, P.A. Besselink. Comparative Cell Culture Effects of Shape Memory Metal (Nitinol[®]), Nickel and Titanium: A Biocompatibility Estimation. *Eur. Surg. Res.* 24: 378-382, 1992.

Rabovsky, J. Laboratory studies on silica induced toxicity and relationship to carcinogenicity. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 7: 267-278, 1997.

Randin, J.P. Corrosion behavior of nickel-containing alloys in artificial sweat. *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 649-666, 1988.

Rasmussen, R.E. Repair of chemical carcinogen-induced lesions. Dans: Genetic differences in chemical carcinogenesis. R.E. Khouri, Éditeur, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.67-92, 1980.

Rhalmi S., M. Odin, M. Assad, M. Tabrizian, C.H. Rivard, L'H. Yahia. Hard, Soft Tissue and In Vitro Cell Response to Porous Nickel-Titanium: A Biocompatibility Evaluation. *Biomed. Mater. Eng. (sous presse)*, 1999.

Rogers, S.D., D.W. Howie, S.E. Graves, M.J. Percy, D.R. Haynes. In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *J. Bone Joint Surg.* 79 : 311-315, 1997.

Rose E.C., I.E. Jonas, H.F. Kappert. In vitro investigation into the biological assessment of orthodontic wires. *J. Orofac. Orthop.* 59: 253-264, 1998.

Roots, R., S. Okada. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells. *Radiat. Res.* 64: 306-320, 1975.

Roussin, V. Choix des matériaux pour l'instrumentation vertébrale. Rapport présenté au Docteur Charles-H. Rivard, Hôpital Ste-Justine de Montréal, 1992.

Ryhanen, J., E. Niemi, W. Serlo, E. Niemela, P. Sandvik, H. Pernu, T. Salo. Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* 35: 451-457, 1997.

Ryhanen, J., M. Kallioinen, J. Tuukkanen, J. Junila, E. Niemela, P. Sandvik, W. Serlo. *In vivo* biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy: Muscle and perineural tissue responses and capsule membrane thickness. *J. Biomed. Mater. Res.* 41: 481-488, 1998.

Ryhanen, J. Biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory alloy. Oulu University Library, Oulu University, Oulu, Finlande, 1999.

Sakellaris, P.C., A. Peterson, A. Goodwin, M. Winget, J. Vernikos-Danellis. Response of mice to repeated photoperiod shifts: susceptibility to stress and barbiturates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149: 677-680, 1975.

Salvadori, D.M.F., L.R. Ribeiro, A.T. Natarajan. Effect of beta-carotene on clastogenic effects of mitomycin C, methyl methanesulphonate and bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 9: 53-57, 1994.

Sanders, J.O., A.E. Sanders, R. More, R.B. Ashman. A Preliminary Investigation of Shape Memory Alloys in the Surgical Correction of Scoliosis. *Spine* 18: 1640-1646, 1993.

Savchenko, P.A., V.A. Lazarev, I.V. Sokulov, V.E. Gjunter, A.V. Proskurin. Correction of scoliotic deformities of the vertebral column with superelastic designs. Dans: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montréal, Canada, p.163, 1997.

Schmerling, M.A., M.A. Milkov, A.E. Sanders, J.E. Woosley. Using the Shape Recovery of Nitinol in the Harrington Rod Treatment of Scoliosis. *J. Biomed. Mater. Res.* 10: 879-892, 1976.

Schubert, T.E., J. Cervos-Navarro. The histopathological and clinical relevance of apoptotic cell death in medulloblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57: 10-15, 1998.

Sgouras, D., R. Duncan. Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use: 1 - Use of the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity. *J. Mat. Sc. Mater. Med.* 1: 61-68, 1990.

Shabalovskaya, S., J. Anderegg, J. Cunnick. X – ray spectroscopic and in vitro study of porous TiNi. Dans: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies.* A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.401-406, 1997.

Simon, M., R. Kaplow, E. Salzman, D. Freiman. A vena cava filter using thermal shape memory alloy: Experimental aspects. *Radiology* 125: 87-94, 1977.

Simske, S.J., R. Sachdeva. Cranial bone apposition and ingrowth in a porous nickel-titanium implant. *J. Biomed. Mater. Res.* 29: 527-533, 1995.

Singh, J., D.L. Carlisle, D.E. Pritchard, S.R. Patierno. Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 5: 1307-1318, 1998.

Smith, A., T. Haaf. DNA nicks and increased sensitivity of DNA to fluorescence in situ end labeling during functional spermiogenesis. *Biotechniques* 25: 496-502, 1998.

Snow, E.T. Metal Carcinogenesis: Mechanistic Implications. *Pharmacol. Ther.* 53: 31-65, 1992.

Speck, K.M., A.C. Fraker. Anodic Polarization Behavior of Ti-Ni and Ti-6Al-4V in Simulated Physiological Solutions. *J. Dent. Res.* 59: 1590-1595, 1980.

Stewart, B.W. Mechanisms of Apoptosis: Integration of Genetic, Biochemical, and Cellular Indicators. *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 1286-1296, 1994.

Sugiyama, M., K. Tsuzuki, N. Haramaki. DNA single-stranded breaks and cytotoxicity induced by sodium chromate(VI) in hydrogen peroxide-resistant cell lines. *Mutat. Res.* 299: 95-102, 1993.

Sugiyama, M.. Role of cellular antioxydant in metal-induced damage. *Cell Biology and Toxicology* 10: 1-22, 1994.

Sunderman, F.W. Carcinogenicity of metal alloys in orthopedic prostheses: clinical and experimental studies. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13: 205-216, 1989.

Sunderman, F.W. Search for molecular mechanisms in the genotoxicity of nickel. *Scand. J. Work Environ. Health* 19: 75-80, 1993.

Takamura, K., K. Hayashi, N. Ishinishi, T. Yamada, Y. Sugioka. Evaluation of carcinogenicity and chronic toxicity associated with orthopedic implants in mice. *J. Biomed. Mater. Res.* 28: 583-589, 1994.

Takeshita, F., H. Takata, Y. Ayukawa, T. Suetsugu. Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol). *Biomaterials* 18: 21-25, 1997.

Tazin, I.D. The usage of superelastic shape memory implants in maxillofacial surgery. Dans: *Proceedings of the First International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montréal, Canada, p.186, 1997.

Therman, E., M. Susman (Éditeurs). *Human Chromosomes: Structure, Behavior, and Effects*. Third edition, Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp. 65-69, 1993.

Trépanier, C., T.K. Leung, M. Tabrizian, L'H. Yahia, J.G. Bienvenu, J.F. Tanguay, D.L. Piron, L. Bilodeau. In vivo biocompatibility study of NiTi stents. Dans: *Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies*. A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, T. Duerig, Éditeurs, MIAS, Monterey, CA, USA, pp.423-428, 1997.

Trépanier C., T.K. Leung, M. Tabrizian, L'H. Yahia, J.-G. Bienvenue, J.-F. Tanguay, D.L. Piron, L. Bilodeau. Preliminary Investigation of the Effects of Surface Treatments

on Biological Response to Shape Memory NiTi Stents. *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* 48: 165-171, 1999.

Tubiana, M., J. Dutreix, A. Wambersie (Éditeurs). *Radiobiologie*. Hermann, Paris, France, p.66-67, 1986.

Vahey, J.W., P.T. Simonian, E.U. 3rd Conrad. Carcinogenicity and metallic implants. *Am. J. Orthop.* 24: 319-324, 1995.

Vallbo, C., A.T. Bergenheim, P. Bergstrom, P.O. Gunnarsson, R. Henriksson. Apoptotic tumor cell death induced by estramustine in patients with malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* 4: 87-91, 1998.

Van Humbeeck, J. communication personnelle, 1998.

Vichev, R.G., Y. Liu, J. Van Humbeeck, B. Blanpain, J.P. Celis. Thermally grown oxide films on NiTi Shape Memory Alloys. Dans: *Proceedings of the 7th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis (ECASIA 97)*, Goteborg, Suède, pp.679-682, 1997.

Villiermaux, F., M. Tabrizian, L'H. Yahia, G. Czeremuszkina, D. Piron. Corrosion resistance improvement of NiTi Osteosynthesis Staples by Plasma Polymerized Tetrafluoroethylene Coating. *Biomed. Mater. Eng.* 6: 241-254, 1996.

Villiermaux, F., M. Tabrizian, S. Rhalmi, C.H. Rivard, M. Meunier, G. Czeremutskin, D.L. Piron, L'H. Yahia. Cytocompatibility of NiTi shape memory alloy biomaterials. Dans: Proceedings of the Second International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies. A. Pelton, D. Hodgson, S. Russell, T. Duerig, Éditeurs, Monterey, CA, USA, pp.417-422, 1997.

Waalkes, M.P., S. Rehn, K.S. Kasprzak, H.Q. Issaq. Inflammatory, proliferative, and neoplastic lesions at the site of metallic identification ear tags in Wistar [CrI:(WI)BR] rats. *Cancer. Res.* 47: 2445-2450, 1987.

Wang R.R., Y. Li. In vitro evaluation of biocompatibility of experimental titanium alloys for dental restorations. *J. Prosthet. Dent.* 80: 495-500, 1998.

Wapner, K.L. Implications of metallic corrosion in total knee arthroplasty. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 271: 12-20, 1991.

Watson, R.R. (Éditeur). *In Vitro Methods of Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.37-52, 1992.

Weinberg, R.A. Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146, 1991.

Wennberg, A., G. Hasselgren, L. Tronstad. A Method for Toxicity Screening of Biomaterials Using Cell Cultured on Millipore Filters. *J. Biomed. Mat. Res.* 13: 109-120, 1979.

Wever, D.J., A.G. Veldhuizen, M.M. Sanders, J.M. Schakenraad, J.R. van Horn. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 18: 1115-1120, 1997.

Wever, D.J., A.G. Veldhuizen, J. de Vries, H.J. Busscher, D.R.A. Uges, J.R. van Horn. Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 19: 761-769, 1998.

Wijsman, J.H., R.R. Jonker, R. Keijzer, C.J.H. Van de Velde, C.J. Cornelisse, J. Hein Van Dierendonk. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 7-12, 1993.

Williams, D.F. (Éditeur). *Systemic Aspects of Biocompatibility*. Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.33-85, 1981.

Williams, D.F. (Éditeur). *Fundamental Aspects of Biocompatibility*. Vol. II, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.175-202, 1981b.

Wood, K.A., B. Dipasquale, R.J. Youle. *In situ* labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11: 621-632, 1993.

Xu, J., J.P. Wise, S.T. Patierno. DNA damage induced by carcinogenic lead chromate particles in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 280: 129-136, 1992.

Yahia, L'H. communication personnelle, 1998.

Yamane, Y., M. Ohtawa. Effect of aluminium chloride on metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Gann.* 70: 147-153, 1979.

Yamane, Y., K. Sakai, M. Ohtawa, N. Murata, T. Yarita, G. Ida. Suppressive effect of aluminium chloride administration on mouse lung carcinogenesis by dimethylnitrosamine. *Gann.* 72: 992-996, 1981.

Zhong, Z., W. Troll, K. Koenig, K. Frenkel. Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H_2O_2 formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 50: 7564-7570, 1990.

ANNEXE I

Résumé de communication présentée au 44^e Congrès Annuel de la « Orthopaedic Research Society » à New Orleans, en Louisiane (É.-U.), du 16 au 19 mars 1998. Par la suite, un compte rendu de conférence avec comité de lecture a été publié dans *Journal of Bone and Joint Surgery*. Il s'agit du volume 22 no 3 de l'année 1999, pp. 892-893.

**IN VITRO BIOCOMPATIBILITY TESTING OF NICKEL-TITANIUM BY
ELECTRON MICROSCOPY IN SITU HYBRIDIZATION**

*+Rivard C.H., Assad M., **Yahia L'H., ***Lemieux N.

*+ Centre de Recherche Pédiatrique, Hôpital Ste-Justine, 3175 ch. Côte Ste-Catherine,

Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada

Phone: (514) 345-4796 Fax: (514) 345-4723

E-mail: assad@JUSTINE.UMontreal.CA

Relevance to Musculoskeletal Conditions

Nickel-titanium (NiTi) is a potential candidate for orthopedic implants, but concerns about its biocompatibility have been raised because of its high nickel content. NiTi carcinogenicity potential must first be evaluated using *in vitro* genotoxicity assays.

Introduction

Superelastic and shape-memory NiTi devices have attracted the interest of clinicians in many disciplines including dentistry and orthopedics¹. However, NiTi composition which includes nearly 50% Ni is controversial.

Indeed, recent studies have shown nickel to be responsible for systemic effects such as hypersensitivity and carcinogenicity. Since NiTi carcinogenic potential still remains an enigmatic issue, genotoxicity and carcinogenicity assays will take an important place in a systematic biocompatibility evaluation of NiTi.

The purpose of this study was to verify if NiTi could represent a potential hazard to DNA molecules. To do so, *in vitro* DNA breakage induced by nickel-titanium extracts in semi-physiological conditions was compared to that of current orthopedic biomaterials using the Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL) assay.

Materials and Methods

Biomaterials extraction

Following ISO 10993-3 sample preparation conditions², equiatomic nickel-titanium, commercially pure titanium (cpTi) and 316-L stainless steel (ss316L) rods were reduced in standardized particles ($250 \mu\text{m} < \phi < 500 \mu\text{m}$) and extracted (0.2g biomaterial/ml media) at 37°C for 24 hours in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, 0.1% gentamicin and 1% phytohaemagglutinin. The resulting media were then filtered at 0.2 μm . Untreated and methyl methanesulfonate (MMS)-treated supplemented RPMI media were also established as negative and positive controls respectively.

Cell cultures

Human lymphocytes were prepared by incubating 0.3 ml of whole blood in 5 ml of medium (72h, 37°C). 6h before harvest, either MMS, biomaterial extracts solutions or control medium were added to cultures. After 70h, cells were arrested at metaphase with colcemid. After incubation, cells were centrifuged at 2000 rpm (10 min), resuspended in 0.075M KCl and incubated (15min). Chromosome preparations were centrifuged, fixed in methanol:acetic acid and spread on slides.

In Situ End-Labeling (Fig. 1)

Slides were incubated (30 min) with exonuclease III (100 U), then washed in 2X SSC and PBS. A DNA mix was used in which dTTP was replaced by 20 μ M bio-11-dUTP (37°C, 75 min). Reaction was stopped with 0.5M EDTA. Slides were washed and incubated (45 min) with rabbit anti-biotin (RAB, 1:100 PBS 0.8% HSA). They were rinsed in PBS and incubated with biotinylated anti-rabbit (1:100 PBS 0.8% HSA). After a 2nd addition of RAB, followed incubation with anti-rabbit IgG-gold conjugate, 10 nm (1:10 PBS 0.8% HSA). Specimens were immersed in 3% glutaraldehyde, dehydrated, then coated with formvar.

Electron Microscopy (EM)

Nickel grids were observed using a Philips EM208 operated at 80 kV.

Immunogold counting

Analyses were performed using the public domain NIH Image program developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.

Statistical analysis

Differential immunogold labeling induced by biomaterials was evaluated using a two-way ANOVA followed by a Scheffé F-test as a post-hoc analysis.

Results

Metaphase chromatin showed a significant difference in genotoxicity induction between materials (ANOVA, $p < 0.001$). Indeed, a stronger immunogold labeling was induced by positive controls compared to all other materials (Table I). No statistical difference was observed between negative controls, NiTi, or cpTi. SS316-L induction of DNA strand breaks was significantly higher than the ones elicited by NiTi, cpTi and the medium itself.

TABLE I. Immunogold particles/ μm^2 chromatin

Group	Mean	SE	N
MMS positive controls	345	13	10
NiTi	157*	9	8
CpTi	156*	12	8
ss316-L	238**	16	8
Semi-physiological medium	156*	15	8

*statistically different from positive controls **statistically different from all groups

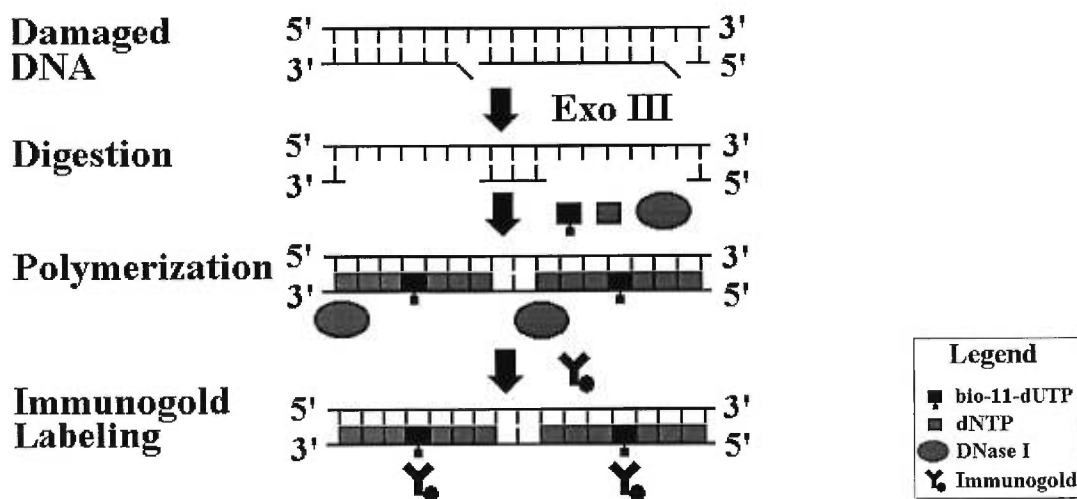


Figure 1: Electron Microscopy *In Situ* End-Labeling (EM-ISEL)

Discussion

In addition to hypersensitivity effects, nickel compounds have been considered strong carcinogens. Many Ni compounds have been identified as carcinogenic in the past: nickel oxide, nickel sulfate and nickel subsulfide. Nickel mechanisms of carcinogenicity may consist in interacting with heterochromatin regions of the chromatin. It would produce DNA strand-breaks and chromosome damage, an important step in carcinogenesis initiation.

Few quantitative *in vitro* genetic toxicology tests directly localize and quantify both DNA damage and DNA repair at the EM level. The EM-ISEL assay constituted a rapid non-isotopic protocol to detect induced DNA single-stranded breaks proportional to the number of immunogold particles observed in EM.

According to the EM-ISEL assay, the relative genotoxicity of NiTi seemed comparable to that of cpTi. NiTi was less genotoxic to metaphase chromosomes than ss316-L which also contains a significant amount of Ni (10-14%). These findings will have to be compared with those from cytotoxicity, sensitization, as well as animal implantation assays in order to definitely conclude to the biocompatibility of NiTi as a biomaterial in orthopedic surgery.

Acknowledgement

This work was supported by Biorthex Project, Montréal (QC) Canada.

References

- 1- J.O. Sanders *et al.* (1993), "A Preliminary Investigation of Shape Memory Alloys in the Surgical Correction of Scoliosis," *Spine* 18(12), 1640-1646.
- 2- ISO (1992), Standard #10 993 - 3, 1st ed., Geneva, Switzerland.

Additional Affiliations

GRBB, École Polytechnique; C.P. 6079, Succ. Centre-Ville, Montréal (QC) H3C 3A7, Canada. *Département de Pathologie, Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal (QC) H3C 3A7, Canada.

ANNEXE II

Compte rendu de conférence publié avec comité de lecture dans la revue *American Journal of Human Genetics*. Il s'agit du numéro 61(4), p.A60, qui fait suite au 47^e Congrès Annuel de l'« American Society of Human Genetics » à Baltimore, Maryland (É.-U.), du 28 octobre au 1er novembre 1997.

GENOTOXICITY ASSESSMENT OF A NICKEL-TITANIUM ALLOY
USING ELECTRON MICROSCOPY *IN SITU* HYBRIDIZATION (EMISH)

M. Assad (1,2), C.H. Rivard (2) and N. Lemieux(1). Departments of (1) Pathology and
(2) Surgery, Ste-Justine Hospital and University of Montreal, Quebec, Canada.

Modern orthopaedic biomaterials are constantly developed to respond to the need for new biomechanical properties. A good example is the increasing world-wide interest towards the potential use of shape memory and superelastic nickel-titanium (Ni-Ti) alloys for biomedical applications. The composition of the metal itself (50% Ni) however makes it a controversial biomaterial and concerns have been raised about its biocompatibility. The carcinogenicity potential of nickel-titanium being of main interest, the relative *in vitro* genotoxicity of Ni-Ti was investigated and also compared to current metallic biomaterials such as commercially pure titanium, 316-L stainless steel, as well as positive and negative controls. To do so, human peripheral blood lymphocytes were cultured in semi-physiological medium which had been previously exposed to the biomaterials. The Electron Microscopy-*In Situ* End-Labeling (EM-ISEL) assay was then performed in order to provide quantification of *in vitro* chromatin DNA breakage. Chromosomes and nuclei were harvested and exposed to exonuclease III which amplifies DNA lesions at 3' ends of breaks. After random priming, incorporation of biotin-dUTP was labelled by immunogold binding which was then detected with electron microscopy. Cellular chromatin exposed to positive controls demonstrated a significantly stronger immunogold labelling than chromatin exposed to nickel-titanium, pure titanium, ss316-L extracts and untreated controls. Moreover, colloidal gold particles staining in presence of Ni-Ti, pure titanium and 316-L stainless steel was not

significantly different than the one elicited by the negative control medium itself. Non-specific labelling was absent regardless of treatment. Therefore, the relative genotoxicity of Ni-Ti seems to be comparable to current orthopaedic biomaterials. However, Ni-Ti genotoxicity level will have to be compared using other cytotoxicity assays in the near future in order to definitely conclude to the biocompatibility of nickel-titanium.

REMERCIEMENTS

Cette thèse de doctorat a été effectuée avec la collaboration du Centre de Recherche Pédiatrique de l'Hôpital Ste-Justine, le Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire de l'Université de Montréal, ainsi que de l'Institut de Génie Biomédical de l'École Polytechnique de Montréal. Je tiens à exprimer ma gratitude à la direction de ces trois institutions pour m'avoir permis d'entreprendre ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement les docteurs Nicole Lemieux, professeure agrégée au Département de Pathologie et Biologie Cellulaire (Université de Montréal), L'Hocine Yahia, directeur du Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux (École Polytechnique de Montréal), et Charles-Hilaire Rivard, chef du Département de Chirurgie (Université de Montréal), pour leur appui constant dans la direction de ce projet de troisième cycle.

J'aimerais remercier aussi les docteurs Jan Van Humbeeck (Département de Génie Métallurgique et des Matériaux, *Katholieke Universiteit Leuven*, Belgique) et Saroj Chakrabarti (Département de Médecine du Travail et d'Hygiène du Milieu, Université de Montréal) pour leurs communications et conseils judicieux. Un merci aussi au Drs Laurent Descarries et Kenneth Watkins qui m'ont permis d'utiliser leurs appareils Macintosh pour la quantification des particules d'or.

Je désire également à exprimer ma reconnaissance à Mesdames Fléchère Fortin, Souad Rhalmi et Annie Bilodeau pour la compétence avec laquelle elles ont fourni

l'appui technique nécessaire à la réalisation de ce projet de doctorat. Un merci spécial à M. Jean Léveillé pour son excellent travail photographique.

J'aimerais remercier le Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux, le Docteur Charles-Hilaire Rivard et le Centre de Recherche de L'Hôpital Ste-Justine, ainsi que le Conseil de recherches en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG) pour le support financier et aussi pour les nombreux congrès auxquels j'ai pu assister grâce à eux.

Un merci aussi à Marie-France Gagnon pour ses encouragements.

Enfin, j'aimerais aussi remercier ma famille pour son support indéfectible tout au long de mes travaux.

