

REGENERATION OSSEUSE : ESSAI PRIMAIRE DE LA TOXICITÉ SYSTÉMIQUE AIGÛE D'UN MATERIAU LOCAL À BASE DE KAOLINITE « LOKPO ».

BONE REGENERATION: PRIMARY TEST OF ACUTE SYSTEMIC TOXICITY OF A LOCAL MATERIAL BASED ON KAOLINITE « LOKPO ».

ZIÉ TRAORÉ ^{1,2*}, VAZOU MANA KOUYATÉ. ^{1,2}, PATRICE KOUAMÉ ¹,
AKALÉ BERNADETTE AKON-LABA ³,
DANIEL AMANTCHI ¹, YVAN ZUNON-KIPRÉ⁴, DANIEL AMANTCHI ¹,
JOSEPH N'GUESSAN ⁵

RESUME

Contexte : Les biomatériaux à base de silice utilisés dans le cadre de la régénération maxillo-faciale subissent des essais de toxicité avant leur utilisation chez l'homme. En Côte d'Ivoire, le laboratoire de chimie des matériaux inorganiques a montré qu'un matériau local dont le nom vernaculaire est le "Lopko" est riche en silice. Un essai préalable de la toxicité systémique aigüe du "Lopko" s'avère nécessaire. L'objectif de ce travail est de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale 50 % (DL₅₀) de ce matériau. **Matériel et méthode :** Il s'agit d'une étude de toxicité systémique aigüe réalisée sur des souris *Mus musculus*. Le "Lopko" à différentes doses a été dissout dans une solution de NaCl 9 ‰, puis injecté à différents lots de souris par voie intrapéritonéale. Par la suite,

les variations de la mortalité des souris ont été notées pendant 24 heures. **Résultats :** Les doses variant entre 700 à 1000 mg/kg de masse corporelle ont provoqué, des agitations, des torsions du corps, une somnolence puis des morts des souris. Par la méthode graphique de Miller et Tainter, la dose maximale tolérée a été déterminée (DMT = 631,39 mg/kg M.C.) ainsi que la dose létale 50 % (DL₅₀ = 839,85 mg/kg M.C.). Cette dernière a été confirmée par la méthode de calcul de Dragsted et Lang. **Conclusion :** La détermination de ces différentes doses permet d'envisager l'implantation *in vivo* du "Lopko" dans un modèle animal.

Mots-clés : SOURIS, DOSE MAXIMALE TOLÉRÉE, RÉGÉNÉRATION OSSEUSE, BIOCOMPATIBILITÉ.

ABSTRACT

Background: Silica-based biomaterials used in maxillofacial regeneration undergo toxicity testing prior to their use in humans. In Côte d'Ivoire, the inorganic materials chemistry laboratory has shown that a local material whose vernacular name is "Lopko" is rich in silica. A preliminary test of the acute systemic toxicity of "Lopko" is necessary. The objective of this work is to determine the maximum tolerated dose (MTD) and the 50% lethal dose (LD₅₀) of this material. **Material and method:** There are an acute systemic toxicity study performed on *Mus musculus* mice. "Lopko" at different doses was dissolved in a 9 ‰ NaCl solution and then injected to different batches of mice intraperitoneally. Subsequently,

changes in mouse mortality were recorded for 24 hours. **Results:** Doses ranging from 700 to 1000 mg/kg body weight caused, agitation, body twisting, drowsiness and then deaths of mice. By the graphical method of Miller and Tainter, the maximum tolerated dose was determined (MTD = 631.39 mg/kg body weight) as well as the 50% lethal dose (LD₅₀ = 839.85 mg/kg body weight). The latter was confirmed by the calculation method of Dragsted and Lang. **Conclusion:** The determination of these different doses allows to consider the *in vivo* implantation of "Lopko" in an animal model.

Key words: Mice, Maximum tolerated dose, Bone regeneration, Biocompatibility.

- 1- Département de pathologies-thérapeutiques, radiologie, anesthésiologie et réanimation de l'UFR d'odontostomatologie de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody (Côte d'Ivoire).
- 2- Laboratoire de Biomorphologie, Pathologies Oro-faciales et Santé bucco-dentaire de l'UFR d'odontostomatologie de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody (Côte d'Ivoire).
- 3- Département de Biologie et matières fondamentales de l'UFR d'odontostomatologie de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody (Côte d'Ivoire) ;
- 4- Laboratoire d'Anatomie Normale et Chirurgie Expérimentale et Biomécanique de l'UFR des sciences médicales d'Abidjan de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody (Côte d'Ivoire).
- 5- Laboratoire de Biologie Santé de l'UFR de Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody.

* **Auteur correspondant:** traoreziea@gmail.com
ORCID : 0000-0003-2237-9026.

I- INTRODUCTION

Une argile comestible à base de kaolinite dont le nom vernaculaire en Côte d'Ivoire est le « Lokpo » a fait l'objet récemment de plusieurs travaux scientifiques [1]. Ces travaux menés au sein du laboratoire de chimie des matériaux inorganiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny ont mis en évidence que le « Lokpo » est riche en silice et en alumine [2]. Aujourd'hui, un consensus scientifique est admis sur le potentiel ostéorégénérateur des matériaux en riche en silice [3]. Ainsi, le « Lokpo » peut-il avoir un effet sur la régénération osseuse ?

La réponse à cette question de recherche, nécessite la réalisation préalable de plusieurs essais. Il s'agit d'essais primaires, d'essais secondaires, d'essais d'utilisations chez l'animal et d'essais cliniques chez l'homme [4]. Concernant les essais primaires, la détermination de la toxicité systémique aiguë (dose maximale tolérée (DMT) et dose létale) du matériau expérimental est nécessaire avant son implantation *in vivo*.

L'objectif de ce travail est donc de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale du (DL) du « Lokpo ».

II-MATERIEL ET METHODES

La réalisation des tests de toxicité systémiques aigües du « lokpo » nécessite l'utilisation de :

II-1 MATÉRIEL

II-1-1 Matériau

Le matériau utilisé dans le cadre de cette étude, est le «Lokpo» extrait du bassin sédimentaire de la ville de Bingerville (Figure n°1). Bingerville est une ville du district autonome d'Abidjan, située dans le sud de la Côte d'Ivoire.



Figure n°1 : Photo du bloc de « lokpo »

II-1-2- Matériel biologique

Des souris *Mus musculus* (Muridae), de souches parentales homogènes *Swiss*, en bonne santé apparentes ont été utilisées. Au total, six lots de 10 souris femelles ont été étiquetées et logés dans des cages avec des copeaux de bois afin de reproduire leur milieu naturel. Ces souris de masse corporelle comprise entre 20g et 25g ont été acclimatées dans des conditions standard de laboratoire pendant 7 jours avant l'expérimentation avec un accès à

la nourriture et l'eau à volonté. Le nettoyage des mangeoires et des abreuvoirs des animaux était fréquemment assuré.

II-1-3 Matériel adjuvant

- La solution de NaCl 9 ‰
- L'autoclave
- Des seringues à usage unique 20G

II-2 METHODES

II-2-1 Considérations éthiques

Cette étude expérimentale chez la souris a été réalisée en accord avec les normes internationales relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

II-2-2 Schéma expérimental de la toxicité aiguë du lokpo en intrapéritonéale (Figure n°2)

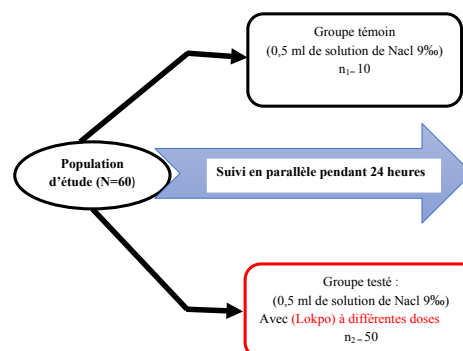


Figure n°2 : Schéma expérimental de la toxicité aiguë de la solution de lokpo en intrapéritonéale

II-2-3 Préparation de la solution de lokpo (KAO)

Le Lokpo a été préalablement pilé dans un mortier, puis tamisé afin d'obtenir une poudre. Par suite, cette poudre a été stérilisée à 120°C à l'autoclave pendant 20 minutes. Après quoi, différentes masses de la poudre ont été diluées dans 0,5 ml d'une solution de NaCl 9 ‰ pour obtenir de différentes concentrations de la solution de lokpo (KAO).

II-2-4 Méthodes d'études de la toxicité aigüe de la solution de lokpo (KAO)

II-2-4-1 Protocole de détermination de la toxicité systémique aigüe par injection intrapéritonéale (IP)

Une première étape a consisté à l'injection intra-péritonéale de différentes concentrations de la solution de lokpo. Cette injection avec une aiguille 20G à usage unique, a concerné le cadran inférieur droit de l'abdomen de la souris. Chaque souris des 5 lots de 10 souris testés, a reçu 0,5 ml de la solution de lokpo en dose unique (évaluée en mg/kg de masse corporelle). Les souris du lot témoin au nombre de 10, ont quant à elle reçu, chacune également 0,5 ml d'une solution de NaCl 9 ‰ par voie intrapéritonéale. Les taux de mortalité ont été déterminés après une période d'observation de 24 heures. Cette première étape a consisté à déterminer les deux doses limites provoquant respectivement 0 % et 100 % de mortalité.

La seconde étape a consisté également à faire des dilutions intermédiaires entre ces deux doses limites obtenues. A l'instar de l'étape initiale, les signes cliniques et le nombre de souris mortes ont été notés.

II-2-4-2 Méthode de détermination de la dose létale 50 % (DL50) et de la dose maximale tolérée (DMT)

- Méthode graphique de détermination de la DL_{50} et de la DMT

La méthode utilisée pour déterminer la dose létale 50 % et la dose maximale tolérée est celle de Miller et Tainter^[5]. Dans cette méthode, les pourcentages de souris mortes ont permis de tracer la courbe de mortalité en fonction du logarithme de la concentration de la solution de lokpo, exprimée en mg/kg de masse corporelle (M.C).

- Méthode de calcul pour la détermination de la DL_{50}

La méthode de calcul de Dragsted et Lang [6] a été également utilisée pour déterminer la DL_{50} . Cette méthode repose sur le postulat suivant :

- tout animal ayant survécu à une dose donnée d'une substance qui lui est administrée survivrait à toute autre dose inférieure de cette substance ;

- de même, tout animal ayant succombé à une dose donnée d'une substance qui lui est administrée, succomberait également à toute autre dose supérieure.

Ainsi, le pourcentage de mortalité ($M\%$) pour une dose donnée de la substance administrée, est donnée par le nombre de spécimens morts (Nm) à cette dose, sur le nombre de spécimens morts plus le nombre de survivants (Nv) : $M\% = Nm \times 100 / Nm + Nv$.

Le calcul de la DL_{50} selon la méthode de Dragsted et Lang s'est fait par la recherche de la valeur approximative de la dose qui correspond à 50% de la mortalité dans un intervalle.

II-2-5 Traitement des résultats

Le logiciel *GraphPad prism 8* a permis le tracé graphique et l'analyse statistique des résultats. Les valeurs ont été données sous la forme d'une moyenne suivie d'un écart type.

III- RÉSULTATS

Les résultats ont concerné, la dose maximale tolérée (DMT), la dose létale 50 %, l'observation clinique après administration (IP) de la solution de lokpo.

III-1 OBSERVATION CLINIQUE DES SOURIS APRÈS ADMINISTRATION INTRAPÉRITONÉALE (IP) DE LA SOLUTION DU LOKPO

L'injection intra-péritonéale de la solution de lokpo (KAO) à des doses inférieures à 700 mg/kg de masse corporel (M.C.) a été sans effet sur les souris. En effet, elles n'ont montré aucun signe clinique observable de toxicité chez ces souris. Les injections (IP) de la solution de lokpo à des doses variantes entre 700 à 1000 mg/kg de masse corporel (M.C.), ont entraîné dans les cinq premières minutes, un déplacement de la souris en longeant les recoins de la cage avec un étirement du tronc, des tremblements, un engourdissement puis frottement du museau avec les pattes antérieures. Après cette période, pour les doses non létales, ces troubles symptomatiques observés ont disparu progressivement. La souris a recouvré l'appétit, s'est abreuvée et a commencé à manger normalement. Cependant, les doses létales ont provoqué une respiration saccadée, une diminution de la motricité de la souris qui est restée blottie dans un angle de la cage. Elle ne s'alimentait plus et a présenté des symptômes d'asthénie. La mort est survenue entre 45 minutes et 24 heures après l'administration de la solution de Lokpo par voie intrapéritonéale.



Figure n°3 : Observation clinique des souris après l'administration (IP) de la solution de lokpo

III-2 Mortalité des souris après administration par voie IP de la solution de lokpo (Kao)

Une première série de tests sur 5 lots de 10 souris a montré que l'injection de doses inférieures ou égales à 700 mg/kg M.C. a provoqué 0 % de mortalité. Cependant les doses supérieures ou égales à 1000 mg/kg M.C. ont entraîné 100 % de mortalité. Dans cet intervalle de dose (700 à 1000 mg/kg M.C.), le taux de mortalité des souris a augmenté en fonction de la dose. Le tableau n°1 ci-dessous indique le nombre de souris mortes et leur pourcentage en fonction de la dose de la solution de lokpo injectée.

Tableau I : Pourcentage de mortalité des souris en fonction de la dose de lokpo injectée

Lots	Dose de lokpo injectée à la souris en mg/kg M.C	Nombre de souris mortes	Pourcentage de mortalité des souris (%)	Pourcentage de mortalité des souris (unités probits)
1	700	0	0	1,9
2	750	2	20	4,15
3	850	5	50	5
4	900	7	70	5,52
5	1000	10	100	8,71

III-3 DÉTERMINATION DE LA DOSE MAXIMALE TOLÉRÉE (DMT) ET LA DOSE LÉTALE 50 % DE LA SOLUTION DE LOKPO PAR LA MÉTHODE GRAPHIQUE DE MILLER ET TAINTER [10]

Les taux de mortalité, obtenus à la suite de l'administration par voie intrapéritonéale de la solution de lokpo ont permis de tracer la courbe de la figure n°4 qui donne les moyennes de variation du taux de mortalité de souris en fonction de la dose de lokpo injectée. Cette courbe dose-réponse est linéarisée par le tracé de la courbe de mortalité, exprimée en valeur probit, en fonction du logarithme de la concentration de lokpo (Tableau I).

Sur la courbe linéarisée, la dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale 50 % (DL_{50}) ont été déterminées. Ainsi, les paramètres toxicologiques déterminés par la méthode graphique de Miller et Tainter [5] sont les suivants : DMT = 631,39 mg/kg M.C. et DL_{50} = 839,85 mg/kg M.C.

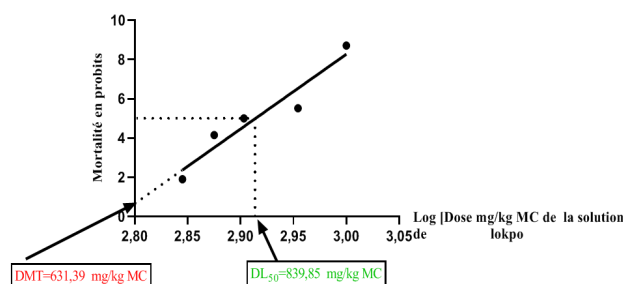


Figure n°4 : Courbe linéarisée de la variation de la mortalité des souris en fonction de la dose de lokpo injectée (transformation probit de Bliss).

IV- DISCUSSION

Cette étude a permis de déterminer les paramètres toxicologiques que sont la dose létale 50 % (DL₅₀) et la dose maximale tolérée (DMT). Cette dernière est la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au témoin. La dose létale 50 % (DL₅₀) quant à elle, est la dose qui tue 50 % des souris. Les symptômes présentés par les souris ont été notés. Les résultats des injections intrapéritonéales de la solution de lokpo ont montré que :

- lorsque les doses sont inférieures à 700 mg/kg M.C, aucune manifestation clinique n'a été signalée chez les souris ;
- lorsque la dose est égale à 700 mg/kg M.C, des signes tels, des déplacements permanents, des tremblements, des engourdissements puis des frottements de museau avec les pattes antérieures, ont été observé ;
- lorsque la dose est égale à 750 mg/kg M.C, alors le taux de mortalité noté a été de 20% ;
- si la dose est égale 850 mg/kg M.C, alors le taux de mortalité noté a été de 50% ;
- pour la dose de 1000 mg/kg M.C, le taux de mortalité a été de 100%.

En somme de 750 à 1000 mg /kg M.C., le taux de mortalité a augmenté de façon dose-dépendante jusqu'à 100 % de mortalité. La dose de 1000 mg /kg M.C. correspond à la dose létale de 100 % (DL₁₀₀).

La méthode graphique de Miller et Tainter a permis de déterminer la dose (DMT) qui est de 631,39 mg/kg M.C. et la DL₅₀ qui est de 839,85 mg/kg M.C.

III-4 DÉTERMINATION DE LA DOSE LÉTALE 50 % DE LA SOLUTION DE LOKPO PAR LA MÉTHODE DE CALCUL DE DRAGSTED ET LANG [6]

La méthode de calcul de Dragsted et Lang a permis de déterminer, pour ces séries d'expériences, la dose létale 50 % suivante : DL₅₀ = 840 mg/kg M.C.

La méthode de calcul de Dragsted et Lang a permis de déterminer une DL₅₀ de 840 mg/kg M.C. Les valeurs des DL₅₀ de la solution du lokpo déterminée selon les deux méthodes (méthode graphique et méthode par calcul) sont proches. Cela indique que les résultats concordent. La DMT déterminée (631,39 mg/kg M.C) est un indicateur de la dose maximale utilisable en toxicologie lors d'une injection de la solution de lokpo en intrapéritonéale ou bien en implantation *in vivo* pour éviter des manifestations cliniques irréversibles chez les animaux d'expérimentation.

La DL₅₀, indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance, permet de mesurer le potentiel toxique, à court terme (toxicité aiguë), d'une substance. Selon les travaux de Diezi (1989) [7], la valeur de la DL₅₀ permet une classification de la substance en fonction de son degré de toxicité. Sur cette base, le lokpo dont la DL₅₀ est 839,85 mg/kg M.C., est faiblement toxique. En conséquence, le lokpo a une forte tolérance à l'égard des souris. Cette étude est en phase avec celle réalisée par Rozhina et al en 2019 [8], dans laquelle, il est démontré que le kaolinite réduit la toxicité aiguë intrinsèque de l'oxyde de graphène sur les cellules eucaryotes. De plus, la kaolinite a une fonction d'élimination de métaux lourds en raison de sa charge positive à pH faible. Par conséquent un pH inférieur à 5 est favorable à la formation de charges positives sur la kaolinite selon Kryuchkova et al (2018) [9]. Cette réduction de la toxicité aiguë pourrait également s'expliquer par la forme planaire que possède cette nano-ar-gile à base de la kaolinite [10]. Récemment, il a été

démontré que les médicaments anticancéreux à base de la kaolinite présentent une innocuité ainsi qu'une activité anticancéreuse élevée dans les lignées cellulaires cancéreuses dans les modèles animaux cancéreux. Par conséquent, la kaolinite est considérée comme un matériau approprié pour le développement de médicaments anticancéreux à libération contrôlée [11]. A cela s'ajoute

le fait que la kaolinite empêche le processus de fixation de métaux lourds toxiques pour l'homme comme le cadmium [12].

Cependant l'étude de N'guessan et al en 2021 [13], combinant *Termitomyces schimperi* avec du kaolin (TSK) n'a montré aucune toxicité aigüe malgré la DL_{50} supérieures à 5000 mg/kg M.C.

CONCLUSION

Cette étude de toxicité aigüe a mis en évidence que le « Lopko » en administration intrapéri-tonéale chez la souris, est faiblement toxique.

Tenant compte de ces résultats, un essai d'implantation *in vivo* chez le rat peut être envisagé avec des doses contrôlées

REFERENCES

1. Coulibaly V, Sei J, Konan LK, Oyetola S, Jdid E, Thomas F. Mineralogical and Chemical Characteristics of Clays Consumed in the District of Abidjan (Côte D'Ivoire). Materials Sciences and Applications. 5: 1048-1059; 2014.
2. Kouakou LPM, Andji-yapi YJ, Coulibaly-kalpy J, Coulibaly KE. Argiles utilisées dans la curation de diverses affections en Côte d'Ivoire: étude de l'effet antibactérien. Rev. Ivoir, Sci. Technol. ; 24 : 84 - 92 ; 2014.
3. Haute Autorité de Santé Substituts osseux : Révision des catégories homogènes de dispositifs médicaux. Note de cadrage. Saint-Denis La Plaine : HAS ; 2013.
4. Grégoire G, Bayle MA, Guyonnet JJ. Evaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux utilisés en odontologie : moyens et protocoles d'expérimentation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Médecine buccale, 28-450-C-10; 2011.
5. Miller LC, Tainter MC, Estimation of LD50 and its Error by means of logarithmic-Probit Graph Paper. Proceedings of Experimental Biology ; 57 : 261-264 ; 1944.
6. Dragstedt A, Lang B. Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. Ann Pharmacol Fr ; 11 ; 1957.
7. Diezi J, Toxicologie : principes de base et répercussions cliniques. In : Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Schorderet M. 2ème Ed. Slatkine-Genève .33-44; 1989.
8. Rozhina, E, Batasheva S, Danilushkina A, Kryuchkova M, Gomzikova M, Cherednichenko Y, Nigamatzyanova L, Akhatova F et Fakhrullin R. Kaolin alleviates the toxicity of graphene oxide for mammalian cells. MedChemComm, 10 (8), 1457-1464; 2019.
9. Kryuchkova M, Fakhrullin R. Environ. Sci. Technol. Lett. 5 (5):295-300; 2018.
10. Petkovic J, Zegura B, Stevanovic M, Drnovsek N, Uskokovic D, Novak S and Filipic M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO2 nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells, Nanotoxicology. 5: 341-353; 2011.
11. Gianni E, Avgoustakis K, Papoulis D. Kaolinite group minerals: Applications in cancer diagnosis and treatment. Eur J Pharm Biopharm. 154:359-376; 2020.
12. N'guessan BB, Amponsah SK, Iheagwara IB, Seidu MA, Frimpong-Manso S, Ofori-Attah E, Bekoe EO, Sarkodie JA, Appiah-Opong R, Asiedu-Gyekye IJ. Toxicity, mutagenicity, and trace metal constituent of *Termitomyces schimperi* (Pat.) R. Heim (Lyophyllaceae) and kaolin, a recipe used traditionally in cancer management in Cote d'Ivoire. J Ethnopharmacol. 10; 276:114-147; 2021.
13. Lee S, Kim J, Kim I, Jang M, Hwang Y, Kim SD. Prediction of Cd toxicity to *Daphnia magna* in the mixture of multi-walled carbon nanotubes and kaolinite. Environ Geochem Health. 41(5):2011-2021; 2019.