

N° 047-2009

Année 2009

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON1

Pour obtenir le

Diplôme de DOCTORAT

(Arrêté du 07 août 2006)

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

Discipline : ODONTOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Céline BRUNOT-GOHIN

Le 24 mars 2009

OPTIMISATION DES ETATS DE SURFACE DU TITANE ET
DES ALLIAGES EN NICKEL-TITANE PAR DES FILMS
MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES

JURY

Monsieur le Professeur Christophe EGLES
Monsieur le Professeur Pierre FARGE
Madame le Docteur Brigitte GROSGOGEAT
Madame le Professeur Dominique LAURENT-MAQUIN
Monsieur le Professeur Philippe MIELE
Madame le Professeur Laurence MORA-PONSONNET
Madame le Professeur Catherine PICART
Monsieur le Professeur Pierre WEISS

Rapporteur
Examineur
Directeur
Examineur
Examineur
Co-Directeur
Examineur
Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université
Vice-président du Conseil Scientifique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET
M. le Professeur J.F. MORNEX
M. le Professeur J. LIETO
M. le Professeur D. SIMON
M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT
Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
Directeur : M. O. ROBIN
Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Electrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
UFR de Mathématiques
UFR d'Informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR STAPS
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon
IUT A
IUT B
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK
Directeur : M. le Professeur H. PINON
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADJ
Directeur : M. le Professeur G. CLERC
Directeur : M. le Professeur P. HANTZPER
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCH
Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
Directeur : M. C. COLLIGNON
Directeur : M. le Professeur R. BACON
Directeur : M. le Professeur J. LIETO
Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
Directeur : M. le Professeur R. LAMARTIN
Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est l'aboutissement de nos cinq années de doctorat. Ce manuscrit expose les différents travaux de recherches réalisés au cours de notre travail et pour lesquels les collaborations intra et inter-laboratoires ont été multiples et fructueuses. La complémentarité et les compétences de chacun ont permis d'ouvrir mon esprit scientifique et de progresser dans une démarche scientifique toujours plus rigoureuse.

Le moment est venu pour moi de remercier très sincèrement l'ensemble des acteurs de ce travail sans qui cette thèse n'aurait pas eu un tel aboutissement.

A mes directrices de thèse,

Madame le Docteur Brigitte GROSGOGEAT (MCU-PH, Université de Lyon)

et

Madame le Professeur Laurence MORA-PONSONNET (PU, Université de Paris 13),

Pour le temps consacré et l'intérêt manifesté tout au long de ces années,
Pour leurs compétences scientifiques et leur conscience professionnelle,
Pour leur rigueur et leur encadrement.

A mes rapporteurs de thèse,

Monsieur le Professeur Christophe EGLES (PU, Université de Boston, USA),

et

Monsieur le Professeur Pierre WEISS (PU-PH, Université de Nantes),

Pour tout le temps dédié à la relecture du manuscrit,
Pour leurs compétences scientifiques à pouvoir rapporter et juger ce travail,
Pour leur gentillesse d'avoir fait le déplacement et être présent dans ce Jury.

A tous les membres du Jury de thèse,

Monsieur le Professeur Pierre FARGE (PU-PH, Université de Lyon),

Madame le Professeur Dominique LAURENT-MAQUIN (PU-PH, Université de Reims),

Monsieur le Professeur Philippe MIELE (PU, Université de Lyon),

Madame le Professeur Catherine PICART (PU, INPG-PHELMA de Grenoble),

Pour leurs compétences scientifiques à juger ce travail et leur présence dans ce Jury.

A Madame Dominique Décorêt, Monsieur Bernard Beaugiraud, et Monsieur Arnaud Brioude,

Pour leur aide précieuse tout au long de ces années de recherche.

A Christelle Lagneau et Catherine Schembri,

Pour leur dévouement et leurs compétences en culture cellulaire.

Aux laboratoires avec lesquels nous avons eu une collaboration fructueuse,

A tous les membres du Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces,

A la société Timet®Savoie (Ugine, France),

Pour la fourniture des échantillons en titane utilisés dans les recherches expérimentales.

A la société A.M.F® (Lury sur Arnon, France),

Pour la fourniture des échantillons en nickel-titane utilisés dans les recherches expérimentales.

A la société Sterigenics (St Romain, Anse, France),

Pour la stérilisation des échantillons à l'oxyde d'éthylène.

Et les plus sincères et intimes remerciements

A mon mari, Vincent,

A mes enfants, Victor et Jules,

A mes parents,

A ma tante Alice,

A toute ma famille et belle-famille.

Table des Matières

Composantes de l'Université Claude Bernard - Lyon1	2
Remerciements	3
Table des matières.....	5
Liste des abréviations et des symboles	8
Table des Illustrations	12
I. INTRODUCTION GENERALE	13
1. CONTEXTE DES RECHERCHES	14
2. PROPOS DES RECHERCHES	15
3. LABORATOIRES D'ACCUEIL	15
4. ORGANISATION DU MANUSCRIT DE THESE	16
II. RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES	17
1. BIOMATERIAUX METALLIQUES EN TITANE ET EN ALLIAGE DE NICKEL-TITANE	18
1.1. LE TITANE (Ti)	18
1.1.1. <i>Caractéristiques du titane</i>	18
1.1.2. <i>Propriétés physiques du titane</i>	18
1.1.3. <i>Propriétés chimiques du titane</i>	19
1.1.4. <i>Propriétés mécaniques du titane</i>	20
1.1.5. <i>Propriétés biologiques du titane</i>	20
1.2. L'ALLIAGE DE TITANE A BASE DE NICKEL : LE NICKEL-TITANE (NiTi)	21
1.2.1. <i>Caractéristiques des alliages en nickel-titane</i>	21
1.2.2. <i>Propriétés physiques des alliages en nickel-titane</i>	21
1.2.3. <i>Propriétés chimiques des alliages en nickel-titane</i>	22
1.2.4. <i>Propriétés mécaniques des alliages en nickel-titane</i>	23
1.2.5. <i>Propriétés biologiques des alliages en nickel-titane</i>	25
1.3. APPLICATIONS BIOMEDICALES DES BIOMATERIAUX METALLIQUES	25
1.3.1. <i>Applications biomédicales du titane</i>	25
1.3.2. <i>Applications biomédicales des alliages en nickel-titane</i>	27
2. OPTIMISATION DES ETATS DE SURFACE DES BIOMATERIAUX METALLIQUES	29
2.1. TRAITEMENTS DE SURFACE PHYSICO-CHEMIQUES DES BIOMATERIAUX METALLIQUES	29
2.1.1. <i>Pourquoi traiter les surfaces des biomatériaux ?</i>	29
2.1.2. <i>Traitements et états de surface du titane</i>	30
2.1.3. <i>Traitements et états de surfaces des alliages en nickel-titane</i>	31
2.2. FONCTIONNALISATION DES SURFACES PAR DES FILMS MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES	33
2.2.1. <i>Pourquoi fonctionnaliser les surfaces des biomatériaux ?</i>	33
2.2.2. <i>Les polyélectrolytes</i>	34
2.2.2.1. <i>Définition des polyélectrolytes</i>	34
2.2.2.2. <i>Nature des polyélectrolytes</i>	34
2.2.2.3. <i>Propriétés d'auto-assemblage des polyélectrolytes</i>	35
2.2.3. <i>Les films multicouches de polyélectrolytes (FMP)</i>	35
2.2.3.1. <i>Définition des FMP</i>	35
2.2.3.2. <i>Conception et adsorption des FMP : la physisorption</i>	36
2.2.3.3. <i>Propriétés des FMP</i>	37
2.3. CARACTERISATIONS DES SURFACES DES BIOMATERIAUX	38
2.3.1. <i>Caractérisation physique des états de surfaces</i>	38
2.3.1.1. <i>Profilométrie ou mesure de la rugosité de surface</i>	38

2.3.1.2.	Mesure de l'angle de contact	38
2.3.2.	<i>Caractérisation physico-chimique des états de surface</i>	41
2.3.2.1.	Spectroscopie photoélectronique X ou X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)...	42
2.3.2.2.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	42
2.3.2.3.	Spectroscopie RAMAN.....	43
2.3.2.4.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	44
2.3.2.5.	Microscopie à force atomique (AFM)	44
2.3.2.6.	Microscopie confocale.....	45
2.3.3.	<i>Evaluation de la biocompatibilité des surfaces</i>	45
2.3.3.1.	Pourquoi réaliser des études biologiques ?	45
2.3.3.2.	Biomatériaux et tissus endobuccaux.....	47
2.3.3.3.	Biomatériaux et réponse cellulaire	48
3.	PERSPECTIVES D'APPLICATIONS BIOMEDICALES DU TITANE ET ALLIAGE EN NICKEL-TITANE FONCTIONNALISES PAR DES FILMS MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES... 50	
3.1.	QUEL AVENIR, POUR QUEL BIOMATERIAU, POUR QUEL TYPE DE FILMS ?.....	50
3.2.	CONTRAINTES LIEES AUX IMPERATIFS DE BIOCOMPATIBILITE DES FMP EN VUE D'APPLICATION CLINIQUE.....	52
3.2.1.	<i>Base précurseur des FMP: la polyéthylèneimine (PEI)</i>	52
3.2.1.1.	Synthèse de la PEI	52
3.2.1.2.	Propriétés chimiques de la PEI	53
3.2.1.3.	Précautions d'emploi de la PEI	53
3.2.2.	<i>Toxicité de la PEI</i>	53
3.3.	CONTRAINTES LIEES AUX IMPERATIFS DE STERILISATION DES FMP EN VUE D'APPLICATION CLINIQUE.....	54
3.3.1.	<i>Pourquoi stériliser les biomatériaux en Odontologie ?</i>	54
3.3.1.1.	Stérilisation et état stérile des biomatériaux.....	54
3.3.1.2.	Circulaires administratives sur la stérilisation	55
3.3.1.3.	Législation et normalisation de la stérilisation	55
3.3.2.	<i>Comment stériliser les dispositifs biomédicaux ?</i>	56
3.3.2.1.	Méthodes de stérilisation à basse température par agents physiques	56
3.3.2.2.	Méthodes de stérilisation à basse température par agents chimiques	58
3.3.2.3.	Méthodes de stérilisation à haute température	60
III.	RECHERCHES EXPERIMENTALES	62
1.	OBJECTIFS.....	63
2.	MATERIEL	64
2.1.	ECHANTILLONS METALLIQUES	64
2.1.1.	<i>Echantillons en Ti et en NiTi</i>	64
2.1.2.	<i>Traitement de surface avant dépôt des polyélectrolytes</i>	64
2.1.3.	<i>Recyclage des échantillons</i>	65
2.2.	POLYELECTROLYTES ET FILMS MULTICOUCHES	65
2.2.1.	<i>La base précurseur : la polyéthylèneimine (PEI)</i>	65
2.2.1.1.	Préparation de la PEI	65
2.2.1.2.	Dépôt de la PEI	65
2.2.2.	<i>Les polyélectrolytes</i>	65
2.2.2.1.	Présentation des polyélectrolytes.....	65
2.2.2.2.	Préparation des polyélectrolytes	66
2.2.3.	<i>Les films multicouches de polyélectrolytes (FMP)</i>	67
2.2.3.1.	Présentation des FMP.....	67
2.2.3.2.	Préparation des FMP	67
2.2.3.3.	Réticulation chimique des FMP.....	68
3.	METHODES	68
3.1.	METHODES DE FABRICATION DES FMP	68
3.1.1.	<i>Fabrication robotisée</i>	68
3.1.2.	<i>Fabrication manuelle</i>	69

3.2.	METHODES DE CARACTERISATION DES SURFACES FONCTIONNALISEES PAR DES FMP	69
3.2.1.	<i>Test de rugosité des substrats métalliques sans FMP</i>	69
3.2.2.	<i>Tensiométrie</i>	70
3.2.3.	<i>Microscopie à force atomique (AFM)</i>	71
3.2.4.	<i>Microscopie confocale</i>	72
3.3.	CULTURES CELLULAIRES ET ETUDES BIOLOGIQUES	72
3.3.1.	<i>Cultures cellulaires</i>	72
3.3.1.1.	Les cellules fibroblastiques	72
3.3.1.2.	Les cellules ostéoblastiques	73
3.3.2.	<i>Etudes biologiques</i>	73
3.3.2.1.	Ensemencement	74
3.3.2.2.	Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	74
3.3.2.3.	Méthode de Mosmann (test MTT)	75
3.4.	METHODES DE STERILISATION ET CARACTERISATION DES SURFACES STERILISEES	76
3.4.1.	<i>Procédés de stérilisation</i>	76
3.4.1.1.	Stérilisation par ultraviolet (UV)	76
3.4.1.2.	Stérilisation par autoclave (AC)	76
3.4.1.3.	Stérilisation par vapeur d'oxyde d'éthylène (ETO)	76
3.4.2.	<i>Test d'efficacité des procédés de stérilisation</i>	77
3.4.3.	<i>Caractérisation physico-chimique des FMP après stérilisation</i>	77
3.4.3.1.	Spectrométrie FTIR	77
3.4.3.2.	Spectroscopie Raman	78
3.5.	ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	78
4.	RESULTATS	79
4.1.	FMP SUR TITANE ET REPONSE CELLULAIRE	79
4.1.1.	<i>Contexte du travail</i>	79
4.1.2.	<i>Synthèse détaillée de la recherche expérimentale</i>	80
4.1.3.	<i>Article scientifique publié : Dent Mater 2008,24(8):1025-35</i>	81
4.2.	PROPRIETES DE LA PEI, BASE PRECURSEUR DES FMP SUR TITANE ET ALLIAGE EN NiTi	88
4.2.1.	<i>Contexte du travail</i>	88
4.2.2.	<i>Synthèse détaillée de la recherche</i>	89
4.2.3.	<i>Article scientifique publié : Biomaterials 2007,28(4):632-40</i>	90
4.3.	STERILISATION DES FMP SUR TITANE ET ALLIAGE EN NiTi	96
4.3.1.	<i>Contexte du travail</i>	96
4.3.2.	<i>Manipulations et article en cours d'élaboration</i>	97
5.	DISCUSSION GENERALE	101
5.1.	OPTIMISATION DES ETATS DE SURFACES DES BIOMATERIAUX METALLIQUES	101
5.2.	CARACTERISTIQUES REQUISES DES FMP EN VUE D'APPLICATION MEDICALE	102
5.2.1.	<i>Caractéristiques physico-chimiques des FMP</i>	102
5.2.2.	<i>Biocompatibilité des FMP</i>	106
5.2.3.	<i>Comportement des surfaces face à un procédé de stérilisation</i>	111
5.3.	BIOACTIVITE DES FMP ET PERSPECTIVES BIOMEDICALES EN ODONTOLOGIE	114
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES POST-DOCTORALES		117
DOCUMENT DE SYNTHESE		120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		127
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS		143
ANNEXES		146

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

Abréviations

- A** Angström
- AA** Acide aminé
- AC** Autoclave
- ADN** Acide Désoxyribonucléique
- Af** Austenite Finish, Température Austénite de Fin
- AFM** Atomic Force Microscopy, Microscopie à Force Atomique
- AFNOR** Association Française de Normalisation
- AMF** Alliage à Mémoire de Forme
- Ar** Argent
- As** Austenite Start, Température Austénite de Départ
- ATNC** Agent Transmissible Non Conventionnel
- AuCd** Alliage Or-Cadmium
- C** Carbone
- CaCo** Cacodylate de Sodium
- CEGELY** Centre de Génie Electrique de Lyon
- Cf Confer*
- Chi** Chitosane
- Cm** Centimètre
- CoCrMo** Cobalt Chrome Molybdène
- COH-CH₂-COH** Glutaraldéhyde
- Coll.** Collaborateur
- Cpc** Couche par couche
- Cu** Cuivre
- DEA** Diplôme d'Etudes Approfondies
- DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO** Diméthyl Sulphoxyde
- DO** Densité Optique
- EA** Equipe d'accueil
- ECPM** Ecole Européenne de Chimie, Polymères, et Matériaux
- EDC** N-Dimethylaminopropyl-Ethylcarbodiimide
- EDTA** Ethylen Diamine Tetracetic Acid
- EN** Norme Européenne
- ESCA** Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, spectroscopie photoélectronique X
- ETO** Oxyde d'Ethylène
- Ex** Exemple

F Fongisone
FAD Fibroblastes Alvéolo-Dentaires
Fe Fer
Fig. Figure
Figs. Figures
FITC Fluoresceine Iso Thio Cyanate
FL Fibroblastes Ligamentaires
FMP Films Multicouches de Polyélectrolytes
FTIR Fourier Transforme Infrared Spectroscopy, spectroscopie par transformée de Fourier
G Gramme
Gpa Gigapascal
h Heure
H Hydrogène
H Hystérèse, Hystérésis
HA Hyaluronan Acid, Acide Hyaluronique
He Hélium
Hv Energie de photons X
Hz Herz
IMB Ingénierie Médicale et Biologique
IR Infrarouge
IRM Imagerie par Résonnance Magnétique
ISO International Organization for Standardization, Organisation Internationale de Normalisation
j jour
J Joule
J-C Jésus-Christ
Kg Kilogramme
L Litre
LBL Layer by layer
LBIPC Laboratoire de Bio-Ingénierie de Polymères Cardiovasculaires
LEIBO Laboratoire des Interfaces et des Biofilms en Odontologie
LMI Laboratoire Multimatériaux et Interfaces
LTDS Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes
m Mètre
m³ Mètre cube
M Mole par litre
MEB Microscopie Electronique à Balayage
MEC Matrice Extra-Cellulaire
Mf Martensite finish, température martensite de fin
Mg Milligramme

Min Minute
Mins Minutes
mL Millilitre
mm millimètre
mm Hg Millimètre de mercure
MPa Mégapascal
Ms Martensite start, température martensite de départ
ms milliseconde
MTT Methylthiozol Tétrazolium
mV millivolt
mW milliwatt
mV/ECS Millivolt par électrode au calomel saturée
N Newton
N Azote
NaCl Chlorure de Sodium
NF Norme Française
NiTi Nickel-Titane
NHS N-Hydroxy-Sulfosuccinimide
Nm Nanomètre
O Oxygène
OsO₄ Tetraoxyde d'Osmium
P Pénicilline
Pa Pascal
PAA Acide Polyacrylique
PAH Polyallylamine Hydrochloride
Pasp Acide polyaspartique
PBS Phosphate Buffer Salin, tampon phosphate salin
PEI Polyéthylènimine, polyethyleneimine
PEG Polyéthylène Glycol
PG *Porphyromonas gingivalis*
PGA Acide polyglutamique
pH Potentiel d'hydrogène
PLL Poly-L-lysine
Plys Polylysine
Pm Piconmètre
PM Poids Moléculaire
PMA Acide Polyméthacrylique
ppm partie par million
PSS Polystyrène Sulfonate

PVS Polyvinyl Sulfate
PVC Plastique Chloré
Ra Rugosité de surface, rugosity average
Rc Indice de dureté C de Rockwell
RAIRS Réflexion Absorption Infrarouge Spectra
S Streptomycine
s Seconde
SEM Scanning Electron Micoscopy
SVF Sérum de Veau Foetal
T° Température
Tabl. Tableau
TGF β1 Transforming Growth Factor β1
Ti Titane
Ti₆Al₄V Alliage en Titane Aluminium Vanadium
Ticp40 Titane commercialement pur, pur commercial Titanium
TiH₂ Hydroxyde de Titane
TiO₂ Oxyde de Titane
TPS Spray Plasma Titanium
TRIS Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV Ultraviolet
V Volt
Vol Volume
XPS X-ray Photoelectron Spectroscopy, spectroscopie photoélectronique X
µg Microgramme
µL Microlitre
µm Micromètre
µs Microseconde

Symboles

< Inférieur à	θ _a Angle à l'avancé
> Supérieur à	θ _r Angle au retrait
+ Plus, positif	° Degré
- Moins, négatif	°C Degré Celsius
± Plus ou moins	µ Micron
= égal	γ Gamma
x multiplication	2D Deux Dimensions
~ Environ	3D Trois Dimensions
% Pour cent	Ω Oméga
θ Angle de Contact	MΩ Mégaoméga

Table des illustrations

Table des figures

- Figure 1 : Relations implant dentaire et le parodonte environnant ;
1a- Schéma, 1b- Vue clinique d'implants dentaires.
- Figure 2 : Méthode de dépôt couche par couche de films multicouches de polyélectrolytes.
- Figure 3 : Schéma d'un film multicouche de polyélectrolytes - Principe de la bicouche.
- Figure 4 : Principe de la profilométrie et mesure de la rugosité.
- Figure 5 : Angle de contact d'un liquide à la surface d'un substrat.
- Figure 6 : Mouillabilité d'un biomatériau (mouillage parfait, imparfait, et nul).
- Figure 7 : Courbe de tensiométrie d'un échantillon témoin dans l'eau –
Pesée du substrat (mg) en fonction de la profondeur (μm).
- Figure 8 : Synthèse de la PEI.
- Figure 9 : Echantillon en titane nu en MEB (x400).
- Figure 10 : Schéma d'un FMP à base de PEI sur du Ti.
- Figure 11: Stockage des échantillons ; 11a- Portoirs usinés en téflon, 11b- Boîtes de Pétri 48 puits.
- Figure 12 : Robot automatique (Dipping robot DR3 Kirstein).
- Figure 13 : Tensiomètre 3S de GBX Instruments.
- Figure 14 : Stérilisation par autoclave – 1^{ers} résultats par spectroscopie FTIR.

Table des tableaux

- Tableau 1 : Propriétés physiques du TiCp .
- Tableau 2 : Propriétés mécaniques du TiCp .
- Tableau 3 : Propriétés physiques des alliages en NiTi.
- Tableau 4 : Propriétés mécaniques des alliages en NiTi.
- Tableau 5 : Les polycations (nom, abréviation, PM, et formule monomérique).
- Tableau 6 : Les polyanions (nom, abréviation, PM, et formule monomérique).
- Tableau 7 : Stérilisations – 1^{ers} résultats des bouillons de Schaedler.
- Tableau 8 : Stérilisation par autoclave – 2^{èmes} résultats des bouillons de Schaedler.
- Tableau 9 : Cahier des charges des FMP en vue d'application biomédicale.

I. INTRODUCTION GENERALE

*« Dans les sciences, le chemin est plus important que le but.
Les sciences n'ont pas de fin ».*

Erwin Chargaff (1905-2002)

1. Contexte des recherches

La plupart des biomatériaux utilisés aujourd'hui dans les sciences médicales ont d'abord été mis au point en vue d'applications industrielles. En Odontologie, le contexte très particulier dans lequel les dispositifs sont amenés à fonctionner soumet les matériaux à de nombreuses agressions. Nous pouvons citer entre autre les agressions mécaniques dues aux forces masticatoires très importantes, électrolytiques dues à la salive, thermiques dues aux variations de température endobuccale, physico-chimiques dues à la variation de pH (jusqu'à 7 points), et bactériologiques. Par conséquence, les biomatériaux utilisés en odontologie doivent d'une part remplir un cahier des charges très strict d'un point de vue biologique, et d'autre part répondre à des exigences physiques, chimiques, et mécaniques bien spécifiques.

Les progrès scientifiques et cliniques en Odontologie ont permis ces quinze dernières années de remplacer des dents absentes par des systèmes de racines artificielles, plus couramment appelés *implants dentaires*. Ces implants sont en titane (Ti), biomatériau métallique de choix pour ces thérapeutiques prothétiques grâce à ses propriétés physico-chimiques, mécaniques, et biologiques satisfaisantes. En effet, la biocompatibilité, la biofonctionnalité, et la biosécurité de ces matériaux implantés dans la cavité buccale sont fondamentales pour le succès clinique et la réussite thérapeutique en implantologie. La perpétuelle quête d'optimiser leur ostéo-intégration, en terme de qualité et de temps, incite les chercheurs à développer des voies de recherche afin d'obtenir un meilleur état de surface.

D'autre part, une des révolutions majeures dans le domaine biomédical a été d'utiliser également des alliages de titane, comme ceux en nickel-titane (NiTi). Les progrès apportés par ces derniers, tant pour l'instrumentation médicale que pour les dispositifs implantables, sont essentiellement liés à leurs propriétés caractéristiques de superélasticité et d'effet mémoire de forme.

Qui plus est, l'optimisation des états de surface par différents types de traitements physico-chimiques permet de modifier les surfaces de ces biomatériaux métalliques tout en améliorant la réponse cellulaire *in vitro* et *in vivo*. De

nombreuses voies de recherche s'ouvrent aujourd'hui en recouvrant les surfaces avec des produits biologiques bioactifs (peptides, collagène, protéines d'adhésion) afin de favoriser d'avantage cette réponse cellulaire. De récentes études ont prouvé que des polyélectrolytes pouvaient recouvrir certains matériaux comme le verre ou le plastique sous forme de films multicouches de polyélectrolytes (FMP) (Decher 1997). Une bibliographie abondante sur ce sujet montre l'intérêt et l'actualité de cette thématique.

2. Propos des recherches

Les propos de notre mémoire développent ainsi l'optimisation des états de surfaces du Ti et des alliages en NiTi par des FMP. Cependant, un grand nombre de paramètres doivent être impérativement analysés avant de pouvoir envisager une potentielle application biomédicale avec ce type de revêtement. Nous pouvons citer par exemple la biocompatibilité des films ou encore leur comportement face à un procédé de stérilisation.

Cette thèse d'université fait suite à un travail réalisé dans le cadre d'un Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Ingénierie Médicale et Biologique (IMB) en 2003-2004 à l'Université Claude Bernard Lyon1. Les multiples perspectives d'élargir les recherches sur ce thème ont fait l'objet de cette thèse. De plus, le rapport intime entre cette thématique et une éventuelle application clinique en implantologie dentaire, en orthodontie, ou encore en endodontie, accentue la continuité de notre formation initiale d'Odontologiste.

3. Laboratoires d'accueil

▪ Laboratoires de direction des recherches

Laboratoire Multimatériaux et Interfaces (LMI), UMR-CNRS 5615,
Equipe Biomateriaux et Interfaces Biologiques,
Université Claude Bernard de Lyon (LYON 1), Faculté d'Odontologie,
Rue Guillaume Paradin, 69 372 Lyon Cedex 08, France
Tél : 33 (0)4 78 77 86 89 ; Fax : 33 (0)4 78 77 87 12
⇒ Dr Brigitte Grosgeat, MCU-PH

Laboratoire de Bio-Ingénierie de Polymères Cardiovasculaires (LBPC), INSERM U 698,
Institut Galilée, Université Paris 13,
99, avenue JB Clément, 93 430 Villetaneuse, France
Tel : 33 (0)1 49 40 36 63 ; Fax : 33 (0)1 49 40 30 08
⇒ Pr Laurence Mora-Ponsonnet, PU

▪ **Collaboration intra-laboratoire**

Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (LMI), UMR-CNRS 5615,
Equipe Biomatériaux et Interfaces Biologiques,
Université Claude Bernard de Lyon (LYON 1), Faculté d'Odontologie,
Rue Guillaume Paradin, 69 372 Lyon Cedex 08, France
Tél : 33 (0)4 78 77 86 89 ; Fax : 33 (0)4 78 77 87 12
⇒ Madame Dominique Décorêt, Assistant ingénieur

Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (LMI), UMR-CNRS 5615,
Université Claude Bernard de Lyon (LYON 1),
43, Boulevard du 11 Novembre 1918, 69 622 Villeurbanne Cedex, France
Tél : 33 (0)4 72 44 84 03 ; Fax : 33 (0)4 72 44 06 18
⇒ Monsieur Arnaud Brioude, MCU

▪ **Collaboration inter-laboratoire**

Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes (LTDS), UMR-CNRS 5513,
Ecole Centrale de Lyon,
36, avenue Guy de Collongue, 69 134 Ecully Cedex, France
Tél : 33 (0)4 72 18 64 22 ; Fax : 33 (0)4 78 33 11 40
⇒ Monsieur Bernard Beaugiraud, Ingénieur de Recherche

4. Organisation du manuscrit de thèse

La première partie du manuscrit de thèse est une étude bibliographique qui met en lumière les biomatériaux métalliques en Ti et NiTi, ainsi que l'optimisation de leurs états de surface. Les perspectives d'applications biomédicales du Ti et du NiTi fonctionnalisés par des FMP sont présentées en abordant les différentes contraintes pour lesquelles le domaine biomédical devra faire face en vue d'une future application clinique.

De cette étude bibliographique, s'ensuit l'étude expérimentale qui propose trois volets :

① Une évaluation de la réponse cellulaire avec des films de différentes compositions polyélectrolytiques.

② Un focus sur la biocompatibilité de la base précurseur des FMP.

③ Une recherche sur l'efficacité de différentes méthodes de stérilisation, puis vérification des propriétés physico-chimiques et biologiques des FMP après un procédé de stérilisation par autoclave.

II. RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

*« Il y a la même différence entre les savants et les ignorants
qu'entre les vivants et les morts ».*

Aristote (384-322 avant J-C)

1. Biomatériaux métalliques en titane et en alliage de nickel-titane

Les biomatériaux sont destinés à remplacer tout ou partie des fonctions ne pouvant plus être assurées par des tissus, un organe ou une partie d'organe déficients. Un biomatériau est un matériau non-vivant, d'origine naturelle ou artificielle, et destiné à interagir avec les systèmes biologiques et tissulaires environnants. Les trois principaux types de biomatériaux utilisés dans le domaine biomédical sont entre autres les métaux, les céramiques, et les polymères.

1.1. Le titane (Ti)

1.1.1. Caractéristiques du titane

Le Ti utilisé dans les applications biomédicales est du titane dit *commerciallement pur* (Ticp).

Ce métal entre dans la fabrication de divers implants chirurgicaux, notamment les stimulateurs cardiaques et les valvules prothétiques, ainsi que les hanches et les rotules artificielles. D'autre part, le Ti est le biomatériau de référence en implantologie dentaire (Bränemark 1983).

Le marché mondial du Ti et de ses alliages s'est considérablement développé depuis les années 1950. Près de 800 tonnes sont annuellement consommées dans le marché médico-dentaire (www.titane.asso.fr).

1.1.2. Propriétés physiques du titane

Le Ti a pour avantage de posséder une faible conductivité thermique.

Sa très faible densité en fait un biomatériau plus léger que les autres métaux utilisés couramment (comme l'acier), tout en restant plus résistant et plus solide.

Il est amagnétique et doté d'un faible coefficient de dilatation thermique (tabl.1).

22

Ti

Propriétés physiques	Unités	Ti
Point de fusion	°C	1660 ± 10
Etat physique	°C	Solide
Densité ou masse volumique	g.cm ⁻³	4,51
Conductivité thermique	W.m ⁻¹ .K ⁻¹	21,6
Résistivité électrique	μΩ.cm	48,2
Chaleur de fusion	kJ/mole	20
Module d'élasticité	hbar*10 ³	10,5

Tableau 1 : Propriétés physiques du Ticp (www.titane.asso.fr).

1.1.3. Propriétés chimiques du titane

Le Ti se présente sous deux structures cristallines avec transformation réversible à 882°C : le Ti alpha (stable jusqu'à 882°C) et le Ti bêta (stable de 882°C jusqu'au point de fusion). L'addition d'éléments d'alliage fait apparaître un domaine alpha-bêta. A haute température, le Ti a une grande affinité pour l'oxygène (O), l'azote (N), le carbone (C), et l'hydrogène (H).

Le pourcentage d'oxygène dissout et contenu dans le métal conditionne le grade de pureté du Ti. Il existe quatre grades de pureté du Ticp allant du grade I avec 99,5 % de Ti au grade IV avec 99 % de Ti. Le degré de pureté modifie les propriétés du Ti, le grade I étant le plus pur et le plus fragile (Meyer et coll. 1993).

Le Ti ne réagit pas avec les bases et la plupart des acides. Le Ticp est soluble dans l'eau très chaude et dans les acides sulfurique ou fluorhydrique mais insoluble dans l'eau froide.

Le Ti se passive spontanément d'une couche d'oxyde de Ti (TiO₂). Cette couche d'une épaisseur de 100 à 200 Å joue un rôle protecteur en empêchant les phénomènes d'oxydation. Elle est adhérente, auto-réparatrice, et stable vis à vis des milieux biologiques. Cette couche de TiO₂ évolue *in vivo* avec le temps et a tendance à s'épaissir jusqu'à 10 fois par formation d'oxydes en surface et/ou en profondeur. Elle est plus épaisse au contact de l'os que de l'air (Zitter et Plenk 1987). Cependant, cette couche d'oxyde n'existe pas en milieu fluoré (Schiff et coll. 2002).

Ainsi, le Ti offre une résistance exceptionnelle à la corrosion pouvant être causée par des attaques extérieures (eau de mer salée, atmosphère humide, milieux aqueux, ou solution polyélectrolytique) ou des attaques organiques (salive, plasma, transpiration, ou cosmétiques) (Meyer et coll. 1993, Esposito et coll. 1998a), mais pas en milieu salivaire acide (Schiff et coll. 2004).

1.1.4. Propriétés mécaniques du titane

Le Ti est fragile à froid mais facilement malléable et ductile à des températures élevées. Son aptitude au formage super élastique et au soudage par diffusion en fait un métal d'intérêt majeur en terme de biomatériaux.

Le Ti possède une résistance à la traction, une limite de fatigue, et une résistance aux chocs très élevées (Exbrayat 1998). Le Ti grippe facilement et résiste mal aux forces de frottement. Sa limite élastique permet d'éviter les déformations permanentes sous diverses contraintes (tabl.2).

Propriétés mécaniques	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
% de Ti	99,5	99,2	99,1	99
Résistance en tension (MPa)	241	348	448	552
Limite élastique (MPa)	172	276	379	483
Allongement (%)	24	20	18	15
Dureté (Rc)	12	20	22,5	26,5

Tableau 2 : Propriétés mécaniques du Ticp (Exbrayat 1998).

1.1.5. Propriétés biologiques du titane

Une des propriétés fondamentales du Ti est sa biocompatibilité (Schnitman et Bränemark 1995, Albrektson 1991). Le Ti a une très bonne tolérance tissulaire et n'entraîne pas de réaction allergisante, immunologique ou mutagène dans le corps humain (Esposito et coll. 1998b, Ryhanen 2000). La couche auto-passivante recouvrant le Ti permet une intégration parfaite de ce biomatériau avec les tissus environnants, qu'ils soient muqueux ou osseux (Zitter et Plenk 1987). Cependant, Sicilia et coll. viennent de démontrer dans une étude clinique que le Ti peut provoquer une réaction allergique chez des patients ayant subi la pose d'implants dentaires en Ti bien que la prévalence soit faible (0,6%) (Sicilia et coll. 2008).

Le Ti est bactériostatique ce qui limite le dépôt de plaque dentaire en surface. Il est inaltérable, amagnétique, et n'interagit pas avec des techniques d'imagerie comme la résonance magnétique (IRM). Son hémocompatibilité est excellente (Exbrayat 1998, Huang et coll. 2003a). Enfin, il n'a pas de goût métallique dans la cavité buccale et ne gêne pas le confort du patient.

L'inconvénient majeur du Ti est sa réactivité en milieu fluoré ce qui pose un problème dans la cavité buccale avec l'utilisation de produits prophylactiques fluorés comme la pâte de dentifrice ou les bains de bouche (Pröbster et coll. 1992, Schiff et coll. 2004).

1.2. L'alliage de titane à base de nickel : le nickel-titane (NiTi)

1.2.1. Caractéristiques des alliages en nickel-titane

Les alliages à mémoire de forme (AMF) ont la capacité de garder en mémoire une forme initiale et d'y retourner après une déformation.

La possibilité d'alterner ces deux formes dépend de deux paramètres : la température qui varie autour d'une température critique, et le comportement superélastique qui permet des allongements sans déformation permanente.

L'effet mémoire de forme fut retrouvé dans différents alliages comme l'or-canadium, le fer-platine, l'indium-cadmium, le fer-nickel, le nickel-aluminium, l'acier inoxydable, et le NiTi (Buehler et Wang 1968).

Il existe toute une variété d'alliage en NiTi en proportion quasi égale de 50%.

1.2.2. Propriétés physiques des alliages en nickel-titane

Les caractéristiques physiques des alliages en NiTi sont indiquées dans le tableau 3.

Propriétés physiques	Unités	NiTi
Point de fusion	°C	1260-1310
Etat physique		solide
Densité ou masse volumique	Kgm ⁻³	6400-6500
Conductivité thermique	w/(m.K)	9-18
Résistivité électrique (Aust et Mart)	$\Omega.m \times 10^{-6}$	0,5-1,1
Chaleur spécifique	J (Kg.K) ⁻¹	470-620
Coefficient de dilatation (Aust et Mart)	10 ⁻⁶ .K ⁻¹	6,6-10
Enthalpie de transformation	J.Kg ⁻¹	280000

Tableau 3 : Propriétés physiques des alliages en NiTi (Garrec et coll. 2005).

1.2.3. Propriétés chimiques des alliages en nickel-titane

Des différences considérables peuvent exister selon le fabricant en ce qui concerne les propriétés de l'alliage, notamment dans la stabilité des alliages en NiTi et dans sa résistance à la corrosion (Essouni et Fisher-Brandies 2002, Huang 2005, Bilhan et coll. 2007). De même que le Ti, les alliages en NiTi s'auto-passivent en surface avec la formation d'une fine couche de TiO₂ qui tend à éliminer les ions Ni et à conférer une surface stable d'un point de vue électrochimique (El Medawar et coll. 2002). Les traitements thermiques, les méthodes de polissage (Imbeni et coll. 2003), et les méthodes de stérilisation (Cissé et coll. 2002) modifient la taille des grains et l'énergie libre du métal. Tous ces facteurs peuvent affecter la couche de passivation et rendre l'état de surface hétérogène.

Le NiTi peut subir une corrosion par piqure dont le fondement serait l'hétérogénéité de la couche de passivation (Sarkar et coll. 1983, Schulte et coll. 2004). La résistance à la corrosion du NiTi dépend du milieu environnant, et particulièrement du pH de ce dernier. La résistance à la corrosion du NiTi dans de l'eau de mer est rapportée pour la première fois par Buelher et Wang en 1968. En 1980, Speck et Fraker démontrent que le NiTi a un meilleur comportement que les alliages CoCrMo et les aciers inoxydables face aux agressions électrochimiques. En solution de salive artificielle, le NiTi a une bonne résistance à la corrosion avec

un potentiel de rupture de 500 mV/ECS (Rocher et coll. 2004) mais moins bonne que le Ti et les alliages CoCrMo (Bilhan et coll. 2007). Cependant, une concentration de 0,6 ppm d'ions Ni est relevée dans une solution de salive artificielle avec une dissolution anodique de Ni stabilisée en 48 heures (Kuphasuk et coll. 2001). En milieu fluoré, le NiTi a un comportement médiocre avec des potentiels de rupture de 90 à 380 mV/ECS (Schiff et coll. 2002/2004). Une diminution du pH accentue les phénomènes de corrosion en entraînant un relargage plus important d'ions Ni (Huang et coll. 2002/2003b). Les alliages en NiTi sont par conséquent sensibles à la corrosion en milieu acide et fluoré (Grosogeat et coll. 2003).

1.2.4. Propriétés mécaniques des alliages en nickel-titane

Au niveau de la structure cristallographique, les AMF possèdent deux phases solides : la martensite et l'austénite. Ces deux phases ont deux systèmes cristallins distincts. Le passage de l'une à l'autre phase peut être partiel ou total mais sans changement volumique. Cette transition est provoquée par des contraintes mécaniques et/ou des variations de température (Li et coll. 2008).

Les alliages en NiTi possèdent ainsi des propriétés particulières liées à leur structure cristalline qui varie en fonction de la température (Jordan et coll. 1997) :

- L' Effet mémoire simple sens

L'alliage est capable de retrouver sa forme initiale par chauffage après une déformation mécanique. La forme initiale est la forme de l'état austénitique. Celle-ci est conservée lorsque la pièce est refroidie. Si une contrainte est appliquée, une déformation permanente est induite après décharge. Le retour à la forme initiale est obtenu lors de la transformation martensite-austénite par simple élévation de la température au dessus de l'austénite finish (Af).

- L' Effet mémoire double sens

Les AMF sont aussi capables de mémoriser une forme à haute température et une autre forme à basse température sans aucune sollicitation mécanique extérieure. Ce comportement découle de différents traitements thermomécaniques appelés *éducations*.

- L' Effet de superélasticité

L'alliage est capable de se déformer jusqu'à 10% de manière réversible sous l'effet d'une contrainte.

Cette propriété est obtenue lorsqu'une contrainte est appliquée à une température constante supérieure à l'Af .

- L' Effet caoutchoutique

Sous forme martensitique, l'alliage déformé conserve une déformation résiduelle après l'application d'une contrainte mécanique. Si le matériau est à nouveau contraint puis déchargé, cette déformation résiduelle augmente.

- L' Effet d'amortissement

L'alliage est capable d'amortir des chocs ou d'atténuer des vibrations mécaniques. La superélasticité de la phase martensitique présente un phénomène d'hystérésis qui entraîne une dissipation de l'énergie.

Les principales caractéristiques mécaniques des alliages en NiTi sont indiquées dans le tableau 4.

Propriétés mécaniques		Unités	NiTi
Module de Young		GPa	70-80
Résistance à la traction		MPa	800-1000
Allongement à la rupture (en Martensite)		%	30-50
Limite de fatigue (en Austénite)		MPa	350
Taille des grains		µm	20-100
Domaine de transformation		°C	-100 à +100
Hystérésis	As-Mf	°C	30-80
	Af-As	°C	30
Déformation maximale	mémoire simple sens	%	8
	mémoire double sens	%	5
Superélasticité	1 cycle	%	8
	100 cycles	%	5
	100000cycles	%	3
	+ de 100000	%	2

Tableau 4 : Propriétés mécaniques des alliages en NiTi.

1.2.5. Propriétés biologiques des alliages en nickel-titane

L'utilisation croissante des alliages en NiTi en médecine impose d'étudier les effets adverses que ce matériau pourrait avoir sur l'organisme (Huang et coll. 2003a, Dong et coll. 2007). Différentes recherches de cytotoxicité n'ont révélés aucun signe de souffrance cellulaire (El Medawar et coll. 2002). Le NiTi est un excellent promoteur de l'adhésion cellulaire (Wirth et coll. 2004, Prymak et coll. 2005). Selon certains auteurs, l'ossification enchondrale serait meilleure au contact de cet alliage qu'au contact du Ti₆Al₄V qui reste l'alliage de référence (Kapanen et coll. 2001). Malgré la présence d'environ 50% de Ni dans ces alliages, le NiTi présente une biocompatibilité satisfaisante (Ryhanen 2000).

En 1997, Wever et coll. montrent qu'aucune réaction d'allergie ou de mutation chromosomique n'a pu être mise en évidence (Wever et coll. 1997). Cependant, le problème majeur des alliages en NiTi provient des phénomènes de corrosion avec une libération exacerbée d'ions Ni (Huang et coll. 2003b/2005). Ces ions Ni peuvent subséquemment engendrer des allergies ou d'autres effets délétères dans les tissus vivants à moyen et long terme (Kobayashi et coll. 2007). Des traitements de surface, par exemple par plasma azoté ou par substance bioactive, peuvent améliorer cette résistance à la corrosion (Cisse et coll. 2002, Poon et coll. 2005/2006, Yeung et coll. 2007, Dong et coll. 2007, Sargeant et coll. 2008).

1.3. Applications biomédicales des biomatériaux métalliques

1.3.1. Applications biomédicales du titane

Le Ti et ses alliages sont utilisés depuis plusieurs décennies en chirurgie orthopédique, en chirurgie endo-vasculaire, en orthopédie dento-faciale, ou encore en Odontologie (prothèse dentaire, implantologie, orthodontie, et endodontie). L'intérêt majeur du Ti en terme de prothèse est sa faible densité volumique par rapport à celle des autres métaux. L'application dentaire la plus courante pour le Ti reste les implants endo-buccaux.

▪ Description des implants dentaires

L'implant est constitué d'un corps, d'un col, et d'une tête implantaire sur laquelle est vissée ou scellée la couronne prothétique. La relation implant-

parodonte est différente de la relation dent-parodonte au niveau histologique. Le corps rugueux est en contact intime avec l'os alvéolaire ; le col lisse est en contact direct avec la gencive attachée (épithélium de jonction et tissu conjonctif) (fig.1a).

Le succès de la mise en place d'un implant est assuré par une totale intégration grâce à une ankylose osseuse du biomatériau au niveau de l'os (ostéo-intégration) et à la bio-intégration au niveau gingival par la formation d'une attache épithéliale étanche (fig.1b) (Bercy et Tenenbaum 1996, Esposito et coll. 1998a, Abrahamsson et coll. 2002, Triplett et coll. 2003).

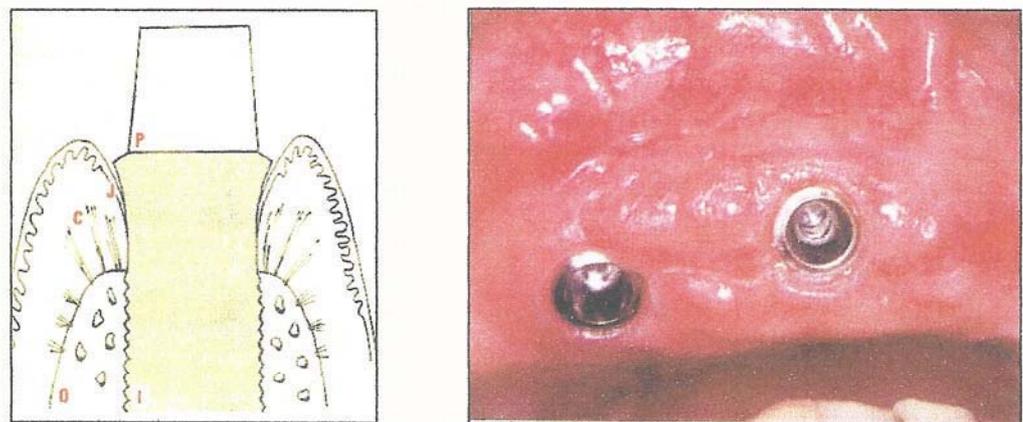


Figure 1 : Relations implant dentaire et parodonte environnant ;
1a- Schéma (C : Tissu conjonctif, I : Implant, J : Epithélium de jonction, O : Os alvéolaire, P : Pilier prothétique), 1b- Vue clinique d'implants dentaires (Bercy et Tenenbaum 1996).

▪ Critères de bio-intégration des implants dentaires

La bio-intégration des implants endo-osseux au niveau de l'os et de la gencive dépend de trois paramètres (Esposito et coll. 1998ab, Triplett et coll. 2003, Albrektson 1991/2008) :

① **Le choix du biomatériau** : le Ti et ses alliages sont aujourd'hui les biomatériaux de référence en terme d'implants.

② **Le dessin de l'implant** : les nombreux implants disponibles dans le commerce sont majoritairement cylindro-coniques avec un pas de vis autotaraudant (Esposito et coll. 1998b, Albrektson 2008).

③ **L'état de surface** : l'état de surface du col est différent de l'état de surface du corps de l'implant. En effet, une surface implantaire rugueuse engendre un comportement cellulaire ostéoblastique favorable alors qu'une surface lisse

entraîne une meilleure réponse fibroblastique (Esposito et coll. 1998b, Wirth et coll. 2004, Wirth et coll. 2008).

Un col lisse favorise par conséquent la bio-intégration muco-gingivale, pérennise les tissus mous péri-implantaires, et minimise la rétention bactérienne en retardant la formation et la maturation de la plaque dentaire (Bercy et Tenenbaum 1996, Abrahamsson et coll. 2002, Albrektson 2008). Un corps rugueux augmente la surface de contact os-implant, améliore la stabilité de l'implant, et favorise la diffusion du plexus de fibrine à sa surface pour une meilleure ostéo-intégration (Esposito et coll. 1998b, Vasconcellos et coll. 2007).

1.3.2. Applications biomédicales des alliages en nickel-titane

Le NiTi est l'alliage le plus étudié dans le domaine biomédical. Son développement est important malgré un coût de production élevé. L'inconvénient majeur est l'impossibilité de soudures sans une modification des propriétés physico-chimiques. L'avantage est son effet de superélasticité. Les AMF utilisés dans le domaine biomédical se composent de Ti et de Ni en proportion atomique quasi identique (50 à 51% de Ni pour 50 à 49% de Ti).

▪ Dispositifs médicaux en NiTi

Les agrafes de compression en NiTi sont employées pour immobiliser les fractures osseuses et promouvoir l'ostéosynthèse. Elles sont implantées directement dans la zone fracturée afin de maintenir une compression entre les deux segments osseux. Une autre application brevetée en collaboration avec le Groupe Lépine est la barre de redressement scoliodontique d'Harrington en nitinol pour redresser les scolioses.

Des plaques d'ostéosynthèse en NiTi peuvent être également utilisées dans le traitement chirurgical de la fracture osseuse maxillo-faciale. Ces plaques permettent le blocage des maxillaires dans le cadre d'un traitement chirurgical orthognatique ou de fracture osseuse accidentelle. Elles sont fixées par l'intermédiaire de vis et permettent de réduire les fractures, d'orienter la cicatrisation, et de préserver l'alignement original de l'os en maintenant une contrainte constante et uniforme sur les deux segments fracturés. Leur part de marché demeure marginale par rapport à celle des plaques en alliage classique à

cause de leur coût plus élevé. Plus récemment, un nouveau type de stent cardio-vasculaire en NiTi a donné lieu à un brevet qui protège sa technique de fabrication par la société industrielle AMF. Le dispositif est un grillage en fil tressé replié sur lui-même qui, une fois introduit dans le vaisseau par endoscopie, se déploie et retourne sous sa phase austénite par la chaleur sanguine.

Depuis 2002, une nouvelle technique de stérilisation féminine est disponible en France. Elle consiste à implanter dans chacune des trompes de Fallope un dispositif médical (Essure®) constitué de fibres de polyéthylène et de spirales en NiTi. Ce dispositif induit une fibrose tissulaire et une obturation des trompes en douze semaines.

Enfin, le concept de chirurgie non invasive est basé sur des instruments qui ne nécessitent pas de grandes incisions tout en gardant un accès facile au site opératoire. A titre d'exemple, des ciseaux déformables endoflex ont été mis au point dans ce but. Ils sont formés d'une tige en NiTi en guise de câble pour diriger et/ou manoeuvrer l'instrument.

▪ Dispositifs dentaires en nickel-titane

Dés 1985, Fukuyo propose d'utiliser les AMF pour la réalisation d'implants dentaires endo-osseux (Sachdeva et coll. 1990). L'utilisation des AMF dans ce type d'intervention assure une meilleure fixation de l'implant grâce à l'exploitation de la mémoire de forme et une plus grande homogénéité dans la répartition des contraintes liées à la mastication sur le parodonte. Malgré ces avantages, la toxicité potentielle liée à la présence de Ni conduit les cliniciens à préférer les implants en TiCp ou en alliage Ti₆Al₄V (Exbrayat 1998). L'idée d'utiliser ces alliages en implantologie dentaire n'a cependant pas été abandonnée puisqu'un brevet concernant un dispositif en alliage massif et poreux de NiTi a été déposé en 2001 par Caterini (annexe 1) (Maurin et coll. 2005). Plus récemment, Maurin et coll. se sont intéressés à la colonisation de matrice poreuse de NiTi par des ostéoblastes en vue d'une éventuelle application en implantologie dentaire. La prolifération remarquable des ostéoblastes laisse entrevoir une très bonne intégration aux tissus osseux. Cependant, des études *in vivo* seront nécessaires afin de confirmer l'intérêt d'une telle matrice (Maurin et coll. 2005).

La superélasticité de arcs orthodontiques en NiTi a été utilisée pour la première fois en orthodontie en 1971 par Andreasen et Hilleman. Le développement des AMF a permis d'obtenir une distribution des contraintes homogènes et constantes dans le temps. L'utilisation des arcs dentaires en NiTi représente un progrès considérable pour les traitements orthodontiques en terme de durée, de pose/dépose immédiate, de visites de contrôle, et de tolérance intra-buccale (Sachdeva et coll. 1990).

En 1988, Walia fabrique les premières limes endodontiques à mémoire de forme à partir de fils orthodontiques en nitinol (Walia et coll. 1988). Au début des années 90, les travaux de Mac Spaden vont faire évoluer cette instrumentation canalaire. Le NiTi donne à l'instrument endodontique une flexibilité qui lui permet de s'adapter à la morphologie canalaire. Cette propriété autorise l'augmentation de la conicité des instruments fixée à 2% par la norme ISO 3630-1:1992 de façon à calibrer l'instrumentation à la forme recherchée lors de la préparation canalaire (Mac Spaden 1993). Les moyens actuels de mise en forme canalaire reposent sur une instrumentation en NiTi de conicité variable (jusqu'à 6%) animée d'un mouvement de rotation continue (ProTaper® de Dentsply-Maillefer, Hero® de Micro-Méga, Quantec® de Tycom, et Endomagic® d'Oral Hygiene Center). Cette rotation continue assure le centrage de l'instrument sur la trajectoire canalaire et facilite l'accès aux courbures. L'inconvénient majeur de ces instruments est leur faible résistance à la rupture lors d'un usage répété, appelée *fatigue oligocyclique* (Di Fiore 2007). Un autre problème reste la stérilisation qui fragilisent les instruments cycle après cycle (Parirokh et coll. 2005, Alexandrou et coll. 2006a/2006b, Viana et coll. 2006). Un meilleur contrôle de l'état microstructural de l'alliage et du coefficient de friction devrait permettre de résoudre ce problème.

2. Optimisation des états de surface des biomatériaux métalliques

2.1. Traitements de surface physico-chimiques des biomatériaux métalliques

2.1.1. Pourquoi traiter les surfaces des biomatériaux ?

Dans le domaine des biomatériaux, l'optimisation des surfaces a pour objectif d'améliorer l'interface tissu-matériau et devient un enjeu majeur. Le but

principal est de modifier la rugosité de surface (Mustafa et coll. 2001, Feng et coll. 2003, Esposito et coll. 1998b, Vasconcellos et coll. 2007, Albrektson 2008), les propriétés mécaniques et physico-chimiques (Tosatti et coll. 2003ab), et les propriétés biologiques (Kilpadi et coll. 1997, Morra et Cassinelli 1997, Lauer et coll. 2001, Keller et coll. 2003, Jayaraman et coll. 2004).

Différentes approches sont exploitées :

- **Des modifications physiques et/ou chimiques des surfaces** améliorent la bio-intégration du métal en favorisant la réponse cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Links et coll. 1998, Ponsonnet et coll. 2003, Satsangi et coll. 2003, Le Guéhennec et coll. 2007). Différents traitements existent afin d'obtenir ces modifications de surface et l'association de plusieurs d'entre eux augmente considérablement le bénéfice de chacun (Mac Donald et coll. 2004).

- **Une fonctionnalisation des surfaces en surface bioactive** peut être également mise en œuvre (Leguen et coll. 2007, Chua et coll. 2008, Hélyary et coll. 2008, Mayingi et coll. 2008).

2.1.2. Traitements et états de surface du titane

▪ Traitements de surface lisse

Une surface lisse est une surface polie miroir sans aucune rugosité (à l'échelle micrométrique) : aucune particule n'est projetée, rajoutée ou retirée. Cet état de surface évite la présence de contaminants du type micro-organismes et/ou résidus tartriques. Son inconvénient est un faible contact os-implant et par conséquent une ostéo-intégration minimisée (Jain et Von Recum 2003, Jain et Von Recum 2004).

▪ Traitements de surface par soustraction

Il existe deux techniques différentes pouvant être combinées : le sablage avec des grains de Ti, et/ou de verre, et/ou d'oxydes d'alumine, et/ou de phosphates de calcium (plus biocompatible), qui provoque la formation de cratères en surface, et le mordantage à l'acide fluorhydrique ou chlorhydrique qui entraîne une rugosité de surface avec des piquetés. Le mordantage a l'avantage d'optimiser

l'ostéo-intégration tout en évitant la présence de contaminants indésirables (Guizzardi et coll. 2004, Le Guéhennec et coll. 2007).

▪ **Traitements de surface par addition**

Il existe différents traitements de surface par addition dont :

- Le revêtement d'hydroxyapatite, abandonné cliniquement en France en 2001 mais aujourd'hui remis sur le marché. Ces surfaces modifiées ont pour avantage de favoriser considérablement l'ostéo-intégration (Esposito et coll. 1998b). En revanche, les deux problèmes majeurs posés par ce type de revêtement sont d'une part une potentielle contamination bactérienne de la surface (Guizzardi et coll. 2004), et d'autre part le manque de cohésion et d'adhésion de cette couche sur le Ti.

- L'oxydation anodique, qui permet de faire varier l'épaisseur de la couche d'oxyde (Le Guéhennec et coll. 2007) .

2.1.3. Traitements et états de surfaces des alliages en nickel-titane

▪ **Traitement de surface par méthodes oxydatives**

Trois méthodes oxydatives existent : le polissage électrolytique, l'oxydation à haute température, et les traitements oxydatifs hydrothermiques.

- Le polissage électrolytique est une méthode d'oxydoréduction qui réduit la rugosité et passive une surface métallique tout en la rendant plus homogène. Des surfaces de géométrie complexe peuvent être traitées ainsi que des matériaux durs. Ce traitement permet d'obtenir une surface plus pauvre en Ni et augmente ainsi la résistance à la corrosion (Thierry et coll. 2000b).

- L'oxydation à haute température (500°C) de pièce de NiTi produit une couche de passivation dépourvue d'ions Ni et plus dure (Firstov et coll. 2002, Ju et Dong 2006).

- Les traitements oxydatifs hydrothermiques en solution d'ion Ti_{4+} ou de TiO_2 à basse température (140°C à 200°C) créent une couche de passivation de TiO_2 cristallisée, plus dense, moins poreuse, et dépourvue d'ions Ni. La résistance à la

corrosion augmente alors significativement tout en préservant les propriétés de l'alliage (Cheng et coll. 2004a/b).

▪ **Traitement de surface augmentant la porosité**

La projection laser de poudre de NiTi et de TiH₂ permet l'obtention de pores tridimensionnels tout en abaissant de taux de Ni en surface à 12%. (Man et coll. 2005). La confection d'une surface poreuse par l'adjonction d'élément facilite la bio-intégration des alliages NiTi. Une autre technique est la projection de poudres d'alliage à haute température et sous forte pression. Cette technique est protégée par le brevet A61L27/00. L'architecture du dispositif mime celle de l'os trabéculaire et permet l'absorption de fluides biologiques par ostéoconduction. La capacité d'intégration est améliorée et le délai de cicatrisation tissulaire raccourci (Maurin et coll. 2005).

▪ **Traitement de surface par méthodes additives**

L'implantation ionique à haute énergie permet de créer une surface avec un taux de Ni amoindri. Cette méthode améliore ainsi les propriétés mécaniques de l'alliage, en l'occurrence la dureté. La pièce peut être placée dans un spray plasma d'ion Ar⁺ et N⁺ et revêtue de TiO₂ (Ju et Dong 2006), de plasma de carbone (Poon et coll. 2006), de tantalate (Kokubo et coll. 2004), d'hydroxyapatite (Pitt 2004, Jiang et Rong 2006), ou encore de nitrite de Ti (Shevchenko et coll. 2004, Yeung et coll. 2007). Cette technique permet aussi d'augmenter la résistance à la fatigue de l'alliage, notamment pour les instruments endodontiques (Pelletier et coll. 2002). L'implantation d'ion carbone par immersion plasma permet la création d'un film amorphe de carbone hydrogéné à la surface du matériau et est proposé par certains fabricants d'arcs orthodontiques pour diminuer les frottements. Cependant, les études scientifiques n'ont pas démontré cette propriété (Poon et coll. 2006). A contrario, Kobayashi et coll. ont montré récemment que la réalisation de films diamantés à base de carbone sur des arcs orthodontiques en NiTi augmentait la dureté et la résistance à l'usure de la surface tout en diminuant le coefficient de friction (Kobayashi et coll. 2007).

2.2. Fonctionnalisation des surfaces par des films multicouches de polyélectrolytes

2.2.1. Pourquoi fonctionnaliser les surfaces des biomatériaux ?

Les recherches actuelles tendent à modifier les surfaces des biomatériaux en déposant des produits biologiques (protéines, peptides, lipopolysaccharides, facteurs de croissance, agent antibactérien) destinés à optimiser le comportement cellulaire *in situ* (Yoshida et coll. 1999, Kapanen et coll. 2001, Liu et coll. 2004, Zhu et coll. 2004). De nombreux articles sont disponibles dans la littérature et l'ensemble de ces études a pour but commun de fonctionnaliser les surfaces de dispositifs médicaux biointégrables dans le corps humain (Kokubo et coll. 2004, Yuan et coll. 2008). La plupart de ces produits biologiques ou chimiques pourrait activer les processus de réparation et de régénération tissulaire *via* une réaction cellulaire (Le Guéhennec et coll. 2007, Hélyary et coll. 2008) et/ou pourrait avoir localement une action antimicrobienne (Boulmedais et coll. 2004, Etienne 2004, Etienne et coll. 2004/2005, Fu et coll. 2005, Zhou et coll. 2007, Yuan et coll. 2008, Zhao et coll. 2008). Les protéines de recrutement et de différenciation cellulaire attirent les cellules vers le biomatériau (chemiotaxis) et/ou transforment des cellules existantes pour participer au processus de réparation. Les protéines d'adhésion cellulaire permettent à la cellule de se fixer sur le biomatériau et d'autres protéines favorisent la multiplication et l'activité cellulaire (Leguen et coll. 2007). Cependant, l'association de biomolécules souvent instables et réactives avec les biomatériaux pose des problèmes en terme de fixation, de relargage, et/ou de préservation de l'activité protéique.

Les films multicouches de polyélectrolytes (FMP) font parti de ces voies intéressantes de recherches (Schaff et Voegel 2002, Khopade et Caruso 2003, Matsumara et coll. 2003, Mahmdi et coll. 2006). L'incorporation de molécules d'intérêts ou médicamenteuses au sein même des couches pourrait créer des surfaces bioactives pour induire une modification du matériau et/ou mimer la situation naturelle au cours de laquelle l'activité cellulaire assure le remodelage de la matrice extracellulaire (Schaaf et Voegel 2002, Etienne et coll. 2006, Hélyary et coll. 2008). Un traitement de surface associé à un dépôt de polyélectrolytes en vue d'optimiser la surface des biomatériaux (bio-intégrables et/ou implantables) fait

actuellement l'objet d'une grande attention de la part des chercheurs (Lakard et coll. 2004, Le Guéhennec et coll. 2007, Hélyary et coll. 2008, Mayingi et coll. 2008).

2.2.2. Les polyélectrolytes

2.2.2.1. Définition des polyélectrolytes

Un polyélectrolyte est un polymère soluble dans l'eau qui, en solution aqueuse, porte des charges électrostatiques. C'est une macromolécule dans laquelle une fraction d'unités constitutives possède des groupements ioniques et/ou ionisables qui se dissocient en ions positifs ou négatifs lorsqu'ils sont en solution aqueuse (Baigl 2003).

Les polyélectrolytes sont omniprésents dans notre environnement. Nous pouvons citer les polysaccharides, les polypeptides et les protéines dont les acides aminés (AA), et les polynucléotides dont l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ils sont depuis déjà longtemps utilisés dans de nombreux domaines. Les polyélectrolytes sont en général biodégradables et biocompatibles (Bolto et Gregory 2007).

2.2.2.2. Nature des polyélectrolytes

Il existe deux catégories de polyélectrolytes. Les polyélectrolytes naturels comme le chitosane (Chi), le dextrane, l'alginate, l'acide hyaluronique (HA) ou encore l'héparine, et les polyélectrolytes artificiels appelés de *synthèse* comme le polystyrène sulfonate (PSS), le polyallylamine hydrochloride (PAH), la poly-L-lysine (PLL), et la polyéthylèneimine (PEI) (Etienne 2004, Bolto et Gregory 2007).

La plupart des polyélectrolytes employés sont aujourd'hui d'origine synthétique. En effet, les polyélectrolytes naturels se trouvent en petite quantité et leur extraction demande de grands efforts de purification, impliquant par conséquent un coût de production élevé. Les polymères synthétiques ont l'avantage de pouvoir être fabriqués en grande quantité, à haute pureté, et avec une grande régularité dans l'enchaînement des monomères. Néanmoins, les polyélectrolytes naturels sont irremplaçables pour des applications bien spécifiques. En effet, leur origine naturelle leur confère des propriétés uniques de biocompatibilité et de biodégradabilité.

Les potentielles applications médicales des polyélectrolytes sont considérables et vont de la vectorisation à la fabrication de substituts biocompatibles ou de biomatériaux (Baigl 2003, Bolto et Gregory 2007).

2.2.2.3. Propriétés d'auto-assemblage des polyélectrolytes

Les polyélectrolytes sont des polymères chargés : les polyélectrolytes chargés positivement se nomment les polycations et ceux chargés négativement les polyanions. Ils interagissent fortement avec les objets de charge opposée et les possibilités d'*auto-assemblage* sont pratiquement infinies (ex : PSS/PAH, HA/PLL) (Bolto et Gregory 2007).

Les principales classes des polyélectrolytes se définissent d'une part en fonction de leur taux de charge, ainsi un polyélectrolyte est dit *faible* (PAH) ou *fort* (PSS), et d'autre part en fonction de leur caractère hydrophile (PLL) ou hydrophobe (PSS).

Les molécules de polymères neutres, quand elles sont en solution, tendent à s'entremêler et former des *pelotes statistiques*. Les chaînes de polymère avec des charges de même signe (positive ou négative) se repoussent les unes des autres et ne peuvent pas s'enrouler sur elles-mêmes, mais au contraire s'allongent et s'étalent (Bolto et Gregory 2007). Les polyélectrolytes peuvent également constituer des structures tridimensionnelles comme des microcapsules qui pourraient servir de vecteur pour des molécules d'intérêt (Khopade et Caruso 2003).

2.2.3. Les films multicouches de polyélectrolytes (FMP)

2.2.3.1. Définition des FMP

Lorsque l'on ajoute un polyélectrolyte à une solution de polyélectrolyte de charge opposée, il se forme des complexes moléculaires inter-chaines. La construction de FMP se fait par auto-assemblage grâce à un dépôt alterné de polycations (charge +) et de polyanions (charge -).

Cette technique simple d'auto-assemblage peut être mise en œuvre sur de nombreux substrats dès lors qu'ils sont chargés et ce quelque soit leur géométrie. Ce procédé a été proposé à l'initiative de Decher en 1992 (Decher 1997). Leur

application au niveau des biomatériaux est la constitution d'interfaces fonctionnalisables.

2.2.3.2. Conception et adsorption des FMP : la physisorption

La méthode du *couche par couche* (cpc) ou *layer by layer* (LBL) permet la formation du FMP (fig.2). Le moteur de la croissance des FMP réside dans l'excès des charges qui apparaît après chaque dépôt de polyélectrolytes et qui permet ainsi une interaction avec le polyélectrolyte du signe opposé (Schaaf et Voegel 2002).

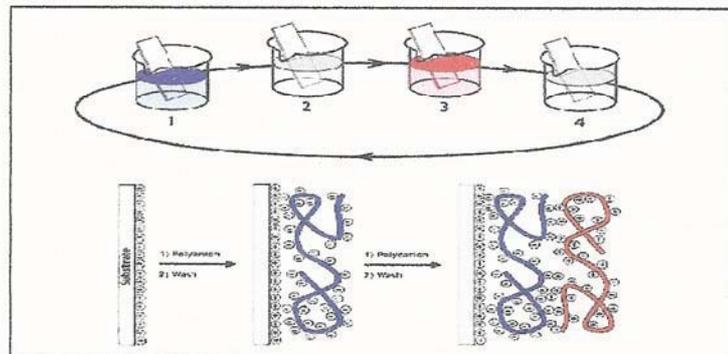


Figure 2 : Méthode de dépôt couche par couche de films multicouches de polyélectrolytes (Decher 1997).

Les polyélectrolytes peuvent être déposés par aérosol (Schlenoff et coll. 2000) ou par trempage (Decher 1997). Quelque soit la technique, une étape de rinçage sépare deux dépôts successifs.

La physisorption conserve l'identité des molécules adsorbées *versus* la chimisorption qui conduit à la rupture des liaisons chimiques afin de créer une liaison covalente entre la molécule et le substrat. L'adsorption des FMP se fait par physisorption et les forces de liaisons non covalentes en présence sont :

- Les liaisons de Van der Waals (forces de dispersion de faible énergie)
- Les liaisons électrostatiques (forces polaires dues au champ électrique),
- Les liaisons hydrogène (dues aux groupements hydroxyle ou amine).

L'interaction entre l'adsorbant et la molécule adsorbée dépend de l'adéquation entre les propriétés ioniques des deux entités (apolaire-polaire,

polaire-polaire), du pH, de la masse molaire, et de la forme de la molécule (Yang et Rubner 2002, Adamczyk et coll. 2007a, Bolto et Gregory 2007).

2.2.3.3. Propriétés des FMP

Les FMP sont très minces, de l'ordre du micromètre, voire du nanomètre.

Une bicouche se compose d'un polycation et d'un polyanion (fig.3) (Decher 1997, Voegel et coll. 2003). L'emploi d'un polyélectrolyte faiblement chargé induit la formation de boucles avec la couche précédente, augmentant ainsi l'épaisseur de la bicouche.

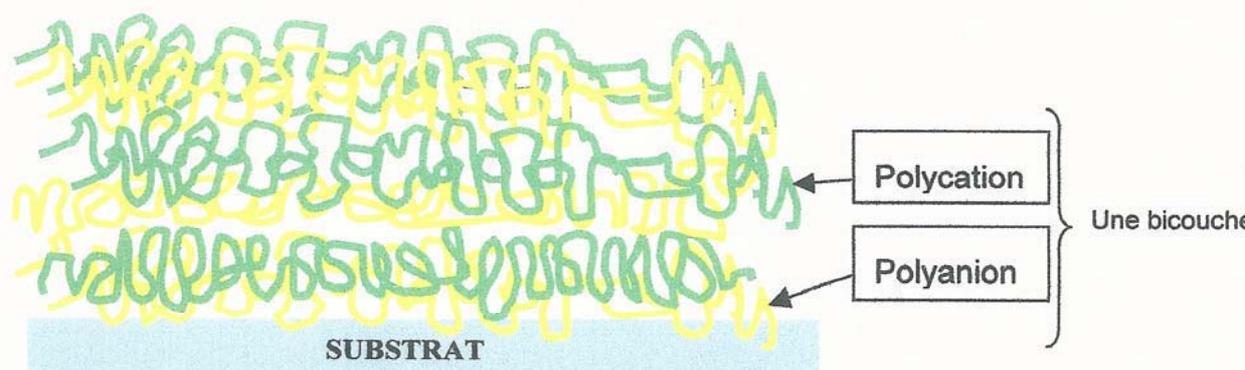


Figure 3 : Schéma d'un film multicouche de polyélectrolytes - Principe de la bicouche.

La nature des polyélectrolytes incorporés va déterminer les caractéristiques physico-chimiques des assemblages (Picart et coll. 2001a, Buron et coll. 2006, Garg et coll. 2008), leur épaisseur (Picart et coll. 2001b), leur stabilité (Richert et coll. 2004b, Schneider et Decher 2008), leur dégradation (Sabot et Krause 2002, Garza et coll. 2005, Picart et coll. 2005), leur densité de charge (Antunes et coll. 2004, Lane et coll. 2008), leur rugosité, leur pH (Burke et Barrett 2003, Gergely et coll. 2004, Garg et coll. 2008, Elzbieciak et coll. 2009), leur mode de croissance linéaire (Porcel et coll. 2006) ou exponentielle (Picart et coll. 2001b, Lavalley et coll. 2002, Porcel et coll. 2007), et leur propriété biologique (Schneider et coll. 2006).

Enfin, les FMP peuvent être réticulés chimiquement après leur construction initiale (Richert et coll. 2004, Schneider et coll. 2007). Le but principal est d'une part de modifier leurs propriétés physico-chimiques de surfaces (rigidité et élasticité), et

d'autre part de pouvoir améliorer *de facto* la réponse cellulaire en terme d'adhésion et de prolifération (Werner et coll. 2009).

2.3. Caractérisations des surfaces des biomatériaux

2.3.1. Caractérisation physique des états de surfaces

2.3.1.1. Profilométrie ou mesure de la rugosité de surface

La profilométrie de contact mesure la rugosité de surface (R_a) d'un matériau à l'aide d'un stylet ou capteur. Les mouvements verticaux du capteur sont affichés graphiquement ou enregistrés par un signal électrique converti numériquement (fig.4). Le R_a calculé correspond à la moyenne des écarts enregistrés sur la surface et s'exprime en μm . Plus le R_a est faible, plus la rugosité est faible.

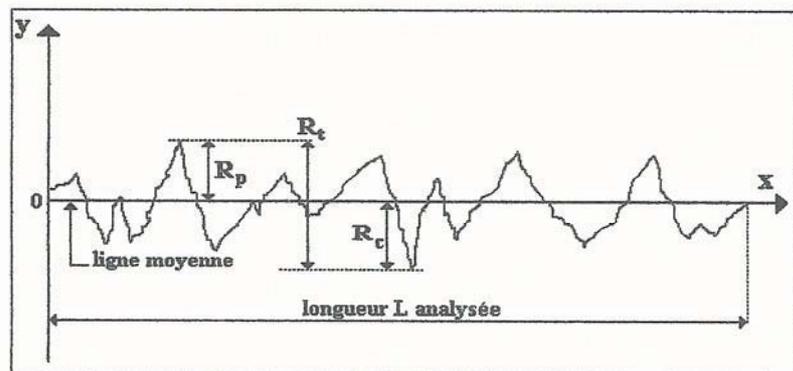


Figure 4 : Principe de la profilométrie ou mesure de la rugosité (Ponsonnet et coll. 2002).

La mesure du R_a est un paramètre classiquement utilisé pour caractériser la rugosité de surface (Ponsonnet et coll. 2002). L'inconvénient majeur est sa faible résolution (Wirth et coll. 2004).

2.3.1.2. Mesure de l'angle de contact

Un liquide mis au contact de la surface d'un solide forme un angle θ de raccordement (fig.5).

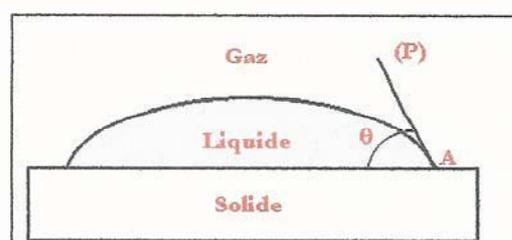


Figure 5 : Angle de contact (θ) d'un liquide à la surface d'un substrat solide.

Cet angle de contact est défini par le plan (P) tangent à la surface de la goutte en (A) et la surface du substrat solide (Chen et coll. 2001, Rupp et coll. 2002). L'angle de contact est lié à la tension superficielle du liquide, à la tension interfaciale entre le liquide et le solide, et à l'énergie de surface du solide (Hermitte et coll. 2004).

La mouillabilité d'un substrat évalue sa capacité à être mouillé par un liquide dans un environnement air-liquide grâce à la mesure de l'angle de contact θ . L'angle de contact dépend des forces de cohésion du liquide et des forces d'adhésion à l'interface solide-liquide. Un angle de contact inférieur à 60° correspond à un substrat hydrophile et au delà de 60° à un substrat hydrophobe (Andrade et coll. 1983, Vogler 1998, Hermitte et coll. 2004). Pour un système liquide-solide donné, le mouillage dépend également de la pression, de la température, et de l'hygrométrie (humidité relative de l'air). Lorsque le mouillage est parfait, l'angle de raccordement devient nul et l'énergie d'adhésion est maximum (fig.6). Ce paramètre détermine ainsi le **caractère hydrophile ou hydrophobe du matériau**.

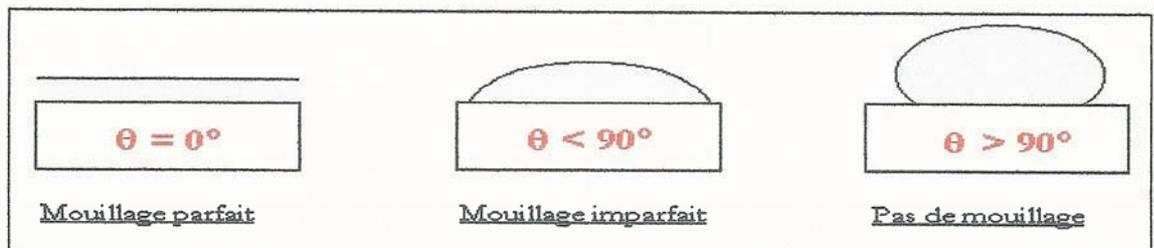


Figure 6 : Mouillabilité d'un biomatériau (mouillage parfait, imparfait, et nul).

L'énergie de surface provient d'une formulation du changement d'énergie libre (enthalpie libre) d'un système thermodynamique. L'énergie de surface se définit comme l'énergie qu'il faut fournir à un atome pour passer de la masse à la surface. **Un changement d'énergie de surface modifie la mouillabilité d'un substrat et la réponse cellulaire.**

Deux méthodes de caractérisation physico-chimique des surfaces permettent de mesurer les angles de contacts :

1) La méthode de la goutte posée ou *sessile drop method*

Il s'agit de la mesure optique de l'angle formé entre une surface solide et la tangente au point d'intersection solide/goutte de liquide.

2) La méthode dynamique de Wilhelmy ou tensiométrie

La force de mouillage sur le solide est mesurée alors que le solide est immergé ou retiré d'un liquide dont la tension superficielle est connue. La méthode dynamique de Wilhelmy permet de mesurer les angles de contact en degré : l'angle à l'avancée (θ_a), l'angle au retrait (θ_r), et l'hystérèse ($\theta_a - \theta_r$). Ces données permettent de déduire ensuite l'énergie totale (en mJ/m^2), les composantes dispersives, ainsi que les composantes acide, base, et acido-basique (Andrade et coll. 1983, Vogler 1998).

En tensiométrie, l'hystérèse de mouillage (H) est la différence entre θ_a (angle à l'avancée) et θ_r (angle au retrait). Ce paramètre caractérise l'état de surface d'un substrat. L'hystérèse caractérise la rugosité et la nature chimique de la surface (polarité, mobilité, gonflement, déformation, réorientation moléculaires) (Mahmdi et coll. 2006, Hermitte et coll. 2004). Une différence notable entre θ_a et θ_r relate d'un état de surface non parfait (rugosité, hétérogénéité chimique, mobilité moléculaire) ou d'une capacité de la surface à se réorienter et/ou à se gonfler au contact du liquide sonde. Un θ_r de 0° signifie que la surface est non rugueuse, et/ou homogène chimiquement et/ou mouillable, et/ou hydrophile, et/ou peu mobile. Une hystérèse différente de 0° indique l'inverse. Une rugosité supérieure à 100 nm peut être responsable d'une hystérèse (Hermitte et coll. 2004).

L'énergie de surface ne peut pas être mesurée directement par cette méthode mais doit être calculée à partir de modèles mathématiques dont celui de Van Oss : on considère la composante dispersive et les interactions acide/base ou liaisons donneur/accepteur d'électrons en tenant compte des interactions par recouvrement orbitaire.

La rugosité, l'hétérogénéité, le gonflement et la mobilité moléculaire de surface sont décrits par l'allure des courbes d'immersion et d'émersion enregistrées durant les cycles du tensiomètre (fig.7). Une courbe de tensiométrie non continue et irrégulière correspond à une surface rugueuse et/ou hétérogène chimiquement. Une courbe de tensiométrie continue et régulière correspond à une surface lisse et homogène (Andrade et coll. 1983, Vogler 1998).

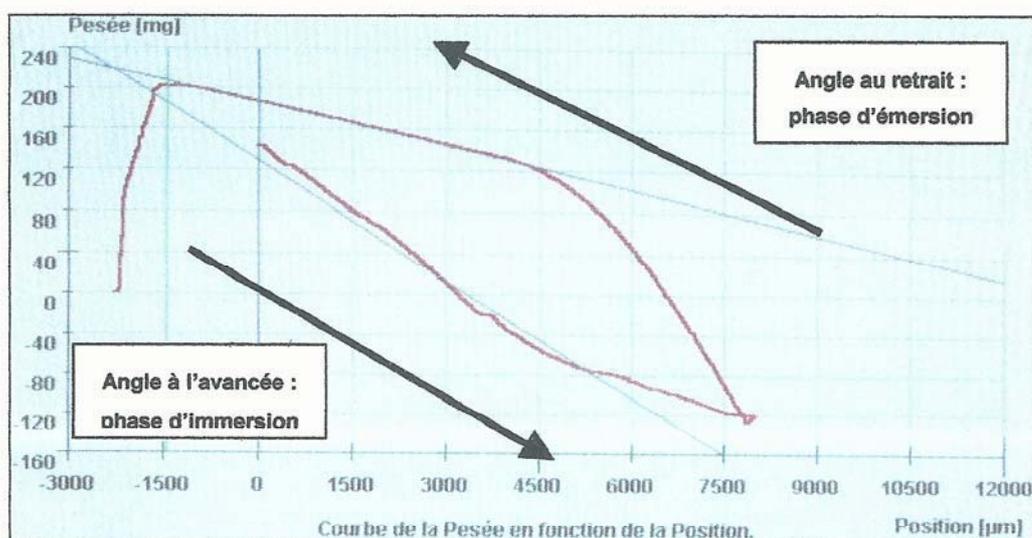


Figure 7 : Courbe de tensiométrie d'un échantillon témoin dans l'eau - Pesée du substrat (mg) en fonction de la profondeur (µm).

Ces techniques apportent ainsi trois informations importantes en terme de caractérisation des surfaces d'un substrat : le caractère hydrophobe ou hydrophile (si le liquide sonde est de l'eau), la mesure de l'énergie libre de surface (à partir de l'exploitation des angles de contact à l'avancée), et la mesure de l'hystérèse. **La tensiométrie a l'avantage de pouvoir évaluer l'état de surface d'un matériau de façon automatique, reproductible, et indépendant de l'opérateur.** Cette mesure dynamique permet de sonder les propriétés mécaniques des chaînes de polymère (réorientation, souplesse) en faisant varier la vitesse de mesure.

2.3.2. Caractérisation physico-chimique des états de surface

Les méthodes de spectroscopie optique permettent une étude des compositions chimiques des surfaces. L'étude architecturale et tridimensionnelle des états de surface peut s'envisager par les techniques de microscopies (à balayage (MEB), à force atomique (AFM), ou encore confocale).

2.3.2.1. Spectroscopie photoélectronique X ou X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Le principe de la XPS consiste à balayer la surface d'un échantillon conducteur par un faisceau monochromatique de photons X d'énergie $h\nu$ selon un angle déterminé. Ce faisceau pénètre plus ou moins dans la matière et des photoélectrons sont alors extraits du matériau. L'énergie cinétique de ces photoélectrons est mesurée par un spectromètre qui détermine l'énergie de liaison des éléments composant le matériau.

Cette méthode spectroscopique, appelée aussi *Electron spectroscopy for chemical analysis* (ESCA), permet d'identifier et de déterminer la concentration atomiques de tous les éléments présents en surface sauf l'hydrogène (H) et l'hélium (He). **La XPS renseigne ainsi sur la nature des éléments constituant la surface et la nature des liaisons chimiques. L'inconvénient est la faible profondeur d'analyse en surface (<10 nm) (Dootz et coll. 2006, Chin et coll. 2007, Köhler et coll. 2007).**

2.3.2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La FTIR est une méthode spectroscopique basée sur l'étude des arrangements atomiques. Les atomes entrent en vibration dans des fréquences bien définies lors de l'émission de rayons infrarouges (IR). La source émet un rayonnement polychromatique qui est renvoyé dans un interféromètre de Michelson. Ce dernier comporte un miroir semi-transparent qui permet d'envoyer une partie du faisceau vers un miroir fixe, et une autre partie vers un miroir mobile oscillant. Les ondes réfléchies par ces miroirs sont transmises vers l'échantillon qui reçoit la somme d'énergie de ces deux faisceaux. Le signal énergétique réémis par l'échantillon au cours du temps est traduit sous forme d'interférogramme et traité par transformée de Fourier (équation mathématique permettant de décomposer un signal complexe en une somme de signaux simples).

Cette méthode permet de détecter la présence de groupes fonctionnels par le mode vibratoire des liaisons atomiques, qu'elles soient covalentes ou ioniques. Les liaisons covalentes sont activées par les infrarouges et donnent des références d'absorption uniques facilement identifiables à fréquence élevée. *A contrario*, les

liaisons ioniques créent des fréquences assez basses dans le moyen infrarouge. Des répertoires de spectres standards sont disponibles et plus de 100 000 composés sont ainsi identifiables grâce à leur spectre. **La FTIR permet d'identifier les produits organiques ainsi que tous les composés comportant des groupes OH. Cette méthode est sensible, rapide, non destructrice, et nécessite peu d'échantillons par analyse.**

2.3.2.3. Spectroscopie RAMAN

Le principe de la spectroscopie Raman consiste à focaliser une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser la lumière diffusée *via* à un monochromateur. Ce dernier permet de mesurer l'intensité lumineuse à l'aide d'un photo-multiplicateur. Les photons diffusés créent (*processus Stokes*) ou détruisent (*processus anti-Stokes*) des vibrations dans l'échantillon. L'analyse en fréquence de cette lumière diffusée met en évidence une composante de même longueur d'onde que le faisceau incident (diffusion *élastique*) et une composante de longueur d'onde différente du faisceau incident (diffusion *inélastique*). Si le photon incident a une énergie supérieure à l'énergie de vibration, on observe un phénomène de diffusion inélastique avec des raies *Rayleigh* (photon incident et diffusé d'énergie identique), des raies *Raman Stokes* (photon diffusé de plus faible énergie), et des raies *Raman anti-Stokes* (photon diffusé de plus grande énergie). La diffusion Stokes est plus intense que la diffusion anti-Stokes, et par conséquent plus fréquemment utilisée. Les vibrations observées peuvent être unique ou multiples. Dans le cas de matériaux désordonnés (des verres par exemple), on observe des bandes larges à la place des raies.

Le Raman permet de caractériser les liaisons entre les atomes et l'organisation de la matière, par opposition à la composition atomique de la surface. Cette technique permet d'obtenir des informations sur la phase cristalline du matériau à l'exception des matériaux amorphe ou transparent. La spectroscopie Raman permet ainsi d'étudier les biomatériaux métalliques dans une gamme spectrale préalablement définie (Nomoto et Onishi 2007/2008) mais également les FMP (Dootz et coll. 2006).

2.3.2.4. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La MEB ou *Scanning Electron Microscopy* (SEM) est une technique de microscopie électronique basée sur les interactions électrons-matière. L'échantillon est préalablement recouvert par un film de métal lourd pour le rendre conducteur. Un faisceau d'électrons est produit par un filament de tungstène chauffé par un courant à très haute tension. Ce faisceau primaire est focalisé sur l'échantillon grâce à des bobines électromagnétiques agissant comme des lentilles. Deux types d'électrons sont alors réémis : les électrons secondaires et rétrodiffusés. Seuls les électrons secondaires fournissent des renseignements sur la topographie de l'échantillon. Ces électrons proviennent des couches superficielles et possèdent une énergie relativement faible. Ils sont très sensibles aux variations de la surface de l'échantillon. *A contrario*, les électrons rétrodiffusés ont une énergie plus élevée et permettent de mesurer l'homogénéité chimique d'un échantillon. Cette analyse qualitative de faible résolution est appelée le *contraste de phase*.

Grâce aux électrons secondaires, la MEB permet une étude morphologique tridimensionnelle après reconstruction d'image numérique des surfaces à l'échelle nanométrique. Cependant, la MEB dénature l'échantillon car elle nécessite sa déshydratation et sa métallisation.

2.3.2.5. Microscopie à force atomique (AFM)

Un appareil d'AFM possède un capteur de force microscopique appelé *cantilever* qui est une sonde très fine de 2 à 3 nm placée au contact direct de l'échantillon. Le principe est basé sur la détection des forces inter-atomiques entre la pointe de ce *cantilever* et la surface de l'échantillon. En mode topographique, trois forces s'équilibrent : la force de Van der Waals attractive, la force coulombienne répulsive, et la force exercée par la pointe. Un faisceau laser se réfléchit à la surface du levier vers un système de diode qui mesure les mouvements du cantilever permettant l'analyse de ses déplacements verticaux.

L'AFM permet d'obtenir une image de la surface étudiée à l'échelle du nanomètre ou de l'angström (Å) (Sirghi et coll. 2001, Lavalley et coll. 2002). Cette méthode est peu invasive et n'altère pas l'échantillon. Son intérêt majeur est de pouvoir observer des structures que la MEB ne permet pas d'analyser à cause de

la déshydratation et de la métallisation des échantillons. **L'AFM permet d'étudier en milieu sec ou aqueux la topographie et la morphologie tridimensionnelle des surfaces des matériaux, des molécules biologiques (bactéries, cellules, protéines et autres biomolécules), et des surfaces inertes tels que les FMP** (Bearinger et coll. 2003).

2.3.2.6. Microscopie confocale

La caractéristique du système confocal est de réaliser des coupes optiques de faible profondeur dans l'échantillon. Le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes choisis en fonction de leurs propriétés à se fixer sur des molécules d'une structure ou d'un objet. L'obtention de coupes optiques virtuelles dans le plan de focalisation permet une représentation en 3D de la surface grâce à la combinaison des coupes en 2D. La résolution de la microscopie confocale est de l'ordre de 500 nm en profondeur et de 200 nm latéralement. Les lasers utilisés le plus fréquemment sont le laser Argon Krypton (488, 568 ou 643 nm) et le laser Hélium Néon (543 ou 633 nm).

La microscopie confocale à balayage laser permet de visualiser à l'aide de sondes fluorescentes la morphologie cellulaire, les protéines (cytosquelette), ou des petites molécules au niveau cellulaire. La localisation de particules ou de molécules spécifiques apporte d'importantes contributions à l'étude des systèmes biologiques (différents niveaux d'organisation cellulaire et sub-cellulaire), des objets inertes, ou des macromolécules. La microscopie confocale permet également d'étudier des spécimens épais sous forme de sections optiques sans détruire l'échantillon. **L'utilisation de traceurs fluorescents spécifiques permet de localiser avec une résolution spatiale de l'ordre du nm des composants macro-moléculaires, mais aussi des petites molécules comme l'on retrouve dans nos FMP** (Picart et coll. 2001a, Richert et coll.2004a).

2.3.3. Evaluation de la biocompatibilité des surfaces

2.3.3.1. Pourquoi réaliser des études biologiques ?

La plupart des biomatériaux sont inertes et non toxiques dotés d'une tolérance biologique satisfaisante. Cependant, certains d'entre eux sont capables de générer diverses réactions chez l'hôte (inflammation, infections, fibroses, effets

mutagènes et/ou cancérigènes). Ainsi, tout matériau destiné à être utilisé dans l'organisme humain doit faire l'objet d'une étude sur sa biocompatibilité.

La biocompatibilité a été définie lors d'une conférence de consensus en Grande Bretagne par DF Williams en 1987 comme *la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique* (Williams 1987/2008). Exbrayat en 1998 propose une définition plus large et la définit comme suit : *La biocompatibilité d'un matériau est l'ensemble des interrelations entre ce matériau et le milieu environnant, et leurs conséquences biologiques locales ou générales, immédiates ou différées, réversibles ou définitives.*

La biocompatibilité est régie à la fois par les effets du matériau sur l'organisme mais aussi par les effets de l'organisme sur le matériau. Ces réactions de l'organisme face à un biomatériau dépendent du milieu d'implantation et de la nature du matériau. Le corps étranger va provoquer au sein de l'organisme des modifications chimiques et physiques qui entraînent des réactions tissulaires et cellulaires appelées *la réponse de l'hôte*. Ces réactions biologiques conduisent à une modification de l'interface matériau-milieu vivant qui se traduit par une adaptation des tissus environnants. **Les réactions biologiques qui gouvernent les interactions cellules/matériau sont complexes et impliquent de nombreux facteurs : la composition chimique du matériau mais également l'état de surface (Kapanen et coll. 2002, Wirth et coll. 2004), et l'énergie de surface (Olivieri et coll. 1992, Den Brader et coll. 1995).** Pour les matériaux à base de Ti, la composition de leur surface diffère généralement de la partie massive par la présence de la couche de TiO₂ qui se forme au contact de l'air, du milieu biologique et notamment des molécules d'eau. La composition et l'épaisseur de cette couche évolue au cours du temps. Il est important de tenir compte d'autres paramètres qui conditionnent l'absence de toxicité d'un dispositif médical en métal comme les impuretés (Huang 2005). Ces impuretés peuvent être soit des activateurs industriels qui peuvent rendre l'alliage toxique (ex : Cu), l'huile d'usinage, ou encore les poussières d'usinage en atelier. De plus, les conditions de fabrication, de stockage et particulièrement les procédés de stérilisation influencent considérablement la composition superficielle du matériau.

L'objectif des études biologiques est d'évaluer la biocompatibilité et les interactions biomatériau/cellules. La biocompatibilité des biomatériaux doit être testée sur trois niveaux : les tests *in vitro*, les tests *in vivo*, et les tests pré-cliniques chez l'homme ou l'animal. *In vitro*, Il existe deux types d'analyses :

- Les analyses de cytotoxicité utilisent des lignées de cellules non spécifiques à fort potentiel de prolifération. Le contact cellulaire se fait sur des temps relativement courts (quelques jours) et le matériau peut être mis directement en contact avec les cellules soit indirectement avec l'interposition de gélose ou d'une membrane (norme EN 30993-5). Des évaluations quantitatives du nombre de cellules vivantes au contact du matériau sont alors réalisées.

- Les analyses de cytocompatibilité permettent d'étudier pendant des temps de contact plus longs (quelques heures à plusieurs dizaines de jours) le comportement au contact du matériau ou de son extrait de cellules différenciées. Le type cellulaire utilisé doit correspondre au type cellulaire rencontré par le dispositif médical lors de son usage clinique. Une évaluation quantitative des paramètres caractéristiques du développement cellulaire (adhésion et prolifération cellulaire) est réalisée selon les normes en vigueur (normes NF S91-142 à S91-146).

2.3.3.2. Biomatériaux et tissus endobuccaux

Deux types de tissus dans la cavité buccale peuvent être décrits : le tissu mou gingival et le tissu dur osseux.

- **Le tissu gingival**

Histologiquement, la gencive possède une composante épithéliale, appelée épithélium gingival, et une composante conjonctive, appelée chorion, les deux étant séparées par une membrane basale. Le chorion gingival est un tissu conjonctif comprenant des cellules dispersées (dont les fibroblastes) et une matrice extra-cellulaire (MEC).

Les fibroblastes représentent la population cellulaire la plus importante du tissu gingival. Il n'existe pas un seul type de fibroblaste mais de nombreuses sous-populations. Nous distinguons les fibroblastes ligamentaires (FL) et les fibroblastes

alvéolo-dentaires (FAD). Seule la migration sélective des FAD dans l'espace lésionnel permet une régénération fonctionnelle de l'ensemble des structures parodontales péri-implantaires (attache épithélio-conjonctive et tissu osseux). Les mécanismes biologiques spécifiques de chimio-attraction, de migration, d'adhésion et de prolifération de ces FAD permettent cette régénération et cette cicatrisation gingivale (Bercy et Tenenbaum 1997).

La MEC comprend des fibres de collagène, des vaisseaux, des nerfs, entourés d'une substance fondamentale dont la consistance ressemble à la gelée. C'est un assemblage complexe de protéines interactives en équilibre dynamique qui peut réguler l'expression génétique des tissus.

- **Le tissu osseux**

Histologiquement, le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé et caractérisé par la nature solide de la MEC. L'implant dentaire est placé au contact de l'os alvéolaire qui se remanie en permanence après l'ostéo-intégration clinique de l'implant (Haga et coll. 2008). L'os alvéolaire est une partie de l'os maxillaire et mandibulaire. Il a une fonction mécanique pour supporter les forces de mastication et protéger les autres organes adjacents, et une fonction métabolique pour assurer le contrôle du métabolisme phosphocalcique.

Le tissu osseux contient 4 types de cellules. Les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont les cellules ostéoformatrices. Les ostéoclastes sont ostéorésorbants. Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules bordantes se trouvent à la surface de l'os alors que les ostéocytes sont situés à l'intérieur de la MEC osseuse. Contrairement aux cellules ostéoformatrices qui dérivent de cellules-souches mésenchymateuses pluripotentes, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocytaire. La MEC osseuse comporte une partie organique et une partie minérale.

2.3.3.3. Biomatériaux et réponse cellulaire

- **Notion d'interface**

Les interactions biomatériau-cellules sont disparates et complexes. La mise en place d'un biomatériau dans le corps humain provoque une réaction

inflammatoire locale et temporaire. Les cellules vont ensuite se fixer sur le matériau ou à sa proximité, et sécréter localement des acides et des oxydants puissants (peroxydes, superoxydes, hydroperoxydes) afin de tenter d'éliminer l'intrus. Les pH locaux peuvent atteindre des valeurs très basses (pH 3-4) et ce milieu se révèle particulièrement éprouvant pour les matériaux. La plupart des matériaux ainsi exposés sont attaqués au moins superficiellement et les résidus d'attaque (ions métalliques, particules, oligomères) sont libérés dans le milieu biologique. Dans certains cas, les matériaux recréent une interface naturelle dans l'organisme : c'est la bio-intégration. Les cellules vont reconstituer les tissus directement au contact du matériau (Esposito et coll. 1998a, Exbrayat 1998, Schnitman et Bränemark 1995). Il ne semble pas exister à ce jour de test permettant de prédire la tolérance d'un individu pour un biomatériau donné.

▪ **Notion d'adhésion et de prolifération cellulaire**

L'adhésion et la prolifération cellulaire dépendent de facteurs biologiques et des caractéristiques physico-chimiques de la surface du biomatériau.

En ce qui concerne les facteurs biologiques, le collagène constitue 30% des protéines du corps humain et se présente sous diverses formes dans le tissu gingival (fibronectine, intégrines). Dans les tissus durs, il y a entre autre de l'ostéocalcine, de l'ostéonectine, de l'ostéopontine, et des sialoprotéines osseuses. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans l'adhérence des cellules à leur substrat. Les facteurs de croissance se lient à des protéoglycanes (ex : transforming growth factor TGF, fibroblast growth factor FGF) et modulent leur activité (O'Neal et coll. 1992, Gronthos et coll. 1997, Murakami et coll. 1999). Ces diverses protéines sont produites par des cellules différenciées (dont les fibroblastes et les ostéoblastes), et interagissent ensemble *via* des messagers inter-cellulaires (facteurs de croissance, cytokines, neurokinines, et dérivés de l'acide arachidonique).

D'autre part, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les caractéristiques physico-chimiques d'un matériau influencent la réponse biologique à sa surface (Andrade et coll. 1983, Vogler 1998) parmi lesquelles nous pouvons citer la rugosité de surface, la mouillabilité, l'hystérèse de mouillage (H), l'énergie de surface, et l'effet de charge.

La rugosité de surface est un paramètre important en terme de bio-intégration. Par exemple, la modification de la topographie en surface du Ti modifie l'interaction du Ti avec les cellules et module l'adhésion cellulaire selon le type de cellule (Eisenbarth et coll. 2002, Ponsonnet et coll. 2002, Rupp et coll. 2004). Richards en 1996 a montré que les fibroblastes proliféraient mieux sur des surfaces lisses que rugueuse. Eisenbarth et coll. en 1996 ont montré qu'une rugosité de 1 μm peut entraîner un changement de forme et de position cellulaire sur la surface.

La mouillabilité d'un biomatériau influence aussi la réponse cellulaire (Pinzari et coll. 2002). Les cellules prolifèrent mieux sur des surfaces moyennement hydrophiles (Ponsonnet et coll. 2003).

L'effet de charge en surface (positif ou négatif) n'est pas un paramètre majeur (Mahmudi et coll. 2006). La nature chimique de la surface est un élément plus important que l'effet de charge.

3. Perspectives d'applications biomédicales du titane et alliage en nickel-titane fonctionnalisés par des films multicouches de polyélectrolytes

3.1. Quel avenir, pour quel biomatériau, pour quel type de films ?

Les applications cliniques *in vivo* des FMP ne sont pas encore réalisées et les recherches restent fondamentales à ce jour. En l'état des connaissances actuelles, la seule et unique étude menée *in vivo* a été réalisée sur des rats grâce à des résines fonctionnalisées par des FMP et mises au contact de la muqueuse endo-buccale (Etienne et coll. 2006). Les résultats ont montré une biocompatibilité des substrats malgré les difficultés de mises en œuvre dans ce lieu d'implantation endo-buccal.

Mahmudi et coll. en 2006 ont montré, *in vitro*, que les films sur du verre à base de PSS/PAH sont plus favorables au développement des fibroblastes que d'autres films constitués d'une nature intrinsèque différente. D'autres études mettent en évidence que ces FMP favorisent la réponse cellulaire de motoneurones, notamment en les fonctionnalisant (Ai et coll. 2003ab, Vodouhe et coll. 2004). Des recherches portent également sur des FMP en vue d'une éventuelle application en chirurgie cardio-vasculaire. En effet, ces films pourraient

recouvrir des surfaces artificielles artériovoineuses en minimisant ainsi les risques de thromboses, grâce à leur vertu anti-agrégante et anti-coagulante (Jones et coll. 2000, Verheye et coll. 2000, Tan et coll. 2003). Boura et coll. en 2003 ont montré que des cellules endothéliales adhéraient et proliféraient de façon excellente sur ce type de films déposés sur du verre (Boura et coll. 2003).

Ces différentes études ouvrent de nouvelles voies de recherches dans de nombreux domaines biomédicaux.

L'intégration de molécules biologiques bioactives comme des protéines d'adhésion ou du collagène (Jessel et coll. 2003, Werner et coll. 2009), des peptides (Chluba et coll. 2001, Ren et coll. 2005, Leguen et coll. 2008), des facteurs de croissance polypeptidiques, des molécules anti-microbiennes (Boulmedais et coll. 2004, Etienne 2004, Etienne et coll. 2004/2005, Zhou et coll. 2007, Wattendorf et coll. 2008, Zhao et coll. 2008) au sein même du film physisorbé à la surface du biomatériau, pourrait optimiser la réponse cellulaire *in vitro* et/ou *in vivo* (Schaff et Voegel 2002, Borodina et coll. 2007a). Une fonctionnalisation de FMP avec du Chi est une voie très prometteuse en terme de lutte antibactérienne (Fu et coll. 2005, Channasanon et coll. 2007, Schneider et coll. 2007, Cai et coll. 2008). L'incorporation d'une séquence peptidique arginine-glycine-acide aspartique (RGD) au sein d'un film à base de Chi/HA ou le couplage du Chi/PLL favoriserait de plus la réponse ostéoblastique (Chua et coll. 2008, Zheng et coll. 2008), celle-ci dépendant également du degré d'acétylation et du poids moléculaire du Chi (Yuan et coll. 2008). Des particules de TiO₂ incorporées à la surface de FMP pourraient aussi être intéressantes en terme de désinfection locale (Ladhari et coll. en 2008). Wang et coll. en 2008 étudient la synergie de relargage d'un médicament associé avec du DNA incorporé dans des FMP microcapsulés à base de PLL et montrent une augmentation d'efficacité de ce relargage (Wang et coll. 2008). D'autres auteurs s'intéressent à la localisation cellulaire de microcapsules, leur stabilité, leur solubilité, et à leur quantification de relargage (Borodina et coll. 2007b, Lee et coll. 2007a, Semmling et coll. 2008). L'ouverture de ces microcapsules pourrait être induite grâce à une photoinduction mais de faible intensité pour ne pas nuire au métabolisme cellulaire (Munoz et coll. 2008), par changement de pH, ou encore au fil du temps.

En terme d'application dentaire, Werner et coll. viennent de montrer en 2009 que des FMP (PLL/PGA)₆-PLL associé à un peptide d'adhésion (laminine) permettaient d'obtenir une surface bioactive à propriété anti-inflammatoire sur du Ti poreux (Werner et coll. 2009). Ces résultats montrent que des FMP peuvent être physisorbés sur ce genre de biomatériaux métalliques, qui plus est bioactifs, et sont en parfaite adéquation avec nos résultats obtenus sur des films PSS/PAH sur Ti (Brunot et coll. 2008). La récente étude de Werner et coll. montrent également que les FMP trouvent une indication particulière en implantologie, puisqu'ils pourraient améliorer la bio-intégration des implants dentaires au niveau de l'attache épithélio-conjonctive du col implantaire avec une réduction de la réaction inflammatoire lors de la pose, une optimisation de la stabilisation primaire de l'implant, et un gain d'étanchéité implant-parodonte à long terme.

3.2. Contraintes liées aux impératifs de biocompatibilité des FMP en vue d'application clinique

3.2.1. Base précurseur des FMP: la polyéthylèneimine (PEI)

La PEI peut être utilisée comme couche précurseur des FMP (Stine et coll. 2009). La PEI étant un polycation, le polyelectrolyte déposé au-dessus doit nécessairement être anionique.

3.2.1.1. Synthèse de la PEI

Le monomère se compose d'un anneau de trois membres. Deux parties de la molécule se composent de liaison CH₂. La troisième partie est un groupe secondaire d'amine NH. En présence d'un catalyseur, ce monomère est converti en polymère fortement embranché avec les groupes primaires d'amine (~25%), groupes secondaires d'amine (~50%), et groupes d'amine tertiaire (~25%). Ce produit s'appelle parfois la *PEI pure* afin de la différencier de certains copolymères d'éthylèneimine et d'acrylamide. Le dernier mélange est un copolymère utilisé pour produire une prétendue *PEI modifiée*, qui a une masse moléculaire de 2 millions de gr/M (fig.8).

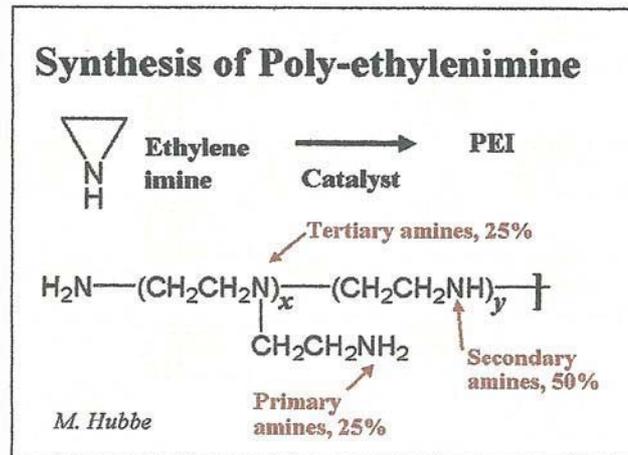


Figure 8 : Synthèse de la PEI (Hubbe, Mini-Encyclopedia of Papermaking Wet-End Chemistry, www4.ncsu.edu/~hubbe/PEI.htm).

3.2.1.2. Propriétés chimiques de la PEI

La PEI est instable chimiquement lorsqu'elle est chauffée. La PEI se décompose et émet alors des gaz toxiques comme le monoxyde de carbone, le dioxyde de carbone, ou encore les oxydes d'azote. D'autre part, la PEI est incompatible chimiquement avec des agents oxydants. Elle réagit lentement avec le chlorure de méthylène et violemment avec le tétrachlorure de carbone (Hubbe 2008)

3.2.1.3. Précautions d'emploi de la PEI

Lors de la manipulation de la PEI, il est recommandé de porter des lunettes et des gants. En effet, la PEI est un élément irritant pour la peau et les yeux. En cas de contact du produit avec ces organes, il faut les rincer rapidement et abondamment avec de l'eau. En cas d'ingestion, une grande quantité d'eau doit être bue ou mieux vaut faire vomir la personne. Dans tous les cas, il est conseillé de faire appel à un médecin (Sigma-Aldrich).

3.2.2. Toxicité de la PEI

La littérature est peu exhaustive en ce qui concerne la toxicité cellulaire de la PEI. Pourtant, deux auteurs évoquent une certaine forme de cytotoxicité de ce polymère envers plusieurs lignées cellulaires. En 2002, Troyen-Toth et coll. étudient le comportement cellulaire d'ostéosarcome et de fibroblastes à phénotype ostéoblastique au contact de différents polyélectrolytes terminaux utilisés lors de la construction de FMP. Les auteurs mettent en évidence une toxicité potentielle de la

PEI par la baisse du développement cellulaire à son contact *versus* d'autres polyélectrolytes sur les mêmes biomatériaux (Tryoen-Toth et coll. 2002a).

D'autre part, la PEI est couramment utilisé dans les transferts de gènes et dans les protocoles de thérapie génique à haute efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* (Vicennati et coll. 2008, Roques et coll. 2009). En 2005, Moghimi et coll. démontrent que la PEI ramifiée (25 kDa) ou linéaire (750 kDa) peut à la fois induire des dommages de membrane et provoquer l'apoptose de trois lignées cellulaires humaines (cellules T de Jurkat, cellules endothéliales, et cellules hépatocytaires). Il définit deux phases de cytotoxicité : la phase (I) initiale qui compromet l'intégrité de la membrane, et la phase (II) à 24h, qui entraîne la formation de canaux dans la membrane mitochondriale externe. Ces observations mettent en lumière d'importantes implications pour la mise au point de protocoles de thérapie génique et pour le contrôle de la distribution intracellulaire des médicaments (Moghimi et coll. 2005).

3.3. Contraintes liées aux impératifs de stérilisation des FMP en vue d'application clinique

3.3.1. Pourquoi stériliser les biomatériaux en Odontologie ?

3.3.1.1. Stérilisation et état stérile des biomatériaux

D'après la norme AFNOR (Association Française de normalisation) NF T72-101, la stérilisation est *la mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer tous les micro-organismes vivants de quelque nature que ce soit, portés par un objet parfaitement nettoyé*. Par définition, l'état stérile d'un produit se traduit par la probabilité de $1/10^6$ de trouver un germe viable ou revivifiable dessus ou dans un produit (Pharmacopée française). Selon la norme européenne EN 556, il est admis qu'une série d'objet est stérile lorsqu'il ne reste qu'un seul objet contaminé sur un million.

Le principe repose sur la destruction de tout micro-organisme vivant, et/ou revivifiable, et/ou potentiellement infectieux du genre bactérie, spore, virus, parasite, levure, champignon, ou encore agents transmissibles non conventionnels (ATNC) comme les prions (statistiquement, tous les microorganismes ne peuvent être tués mais le nombre de survivantes peut devenir extrêmement faible).

3.3.1.2. Circulaires administratives sur la stérilisation

Deux circulaires, émanant du ministère de la Santé, rappellent la nécessité d'utiliser un autoclave à vapeur d'eau pour stériliser le matériel médico-chirurgical :

- La circulaire du 11.12.1995 (n°100) préconise l'utilisation de l'autoclave avec pompe à vide par des cycles de 134°C pendant 18 mins.
- La circulaire du 20.10.1997 (n°97672) relative à la stérilisation des dispositifs médicaux dans les établissements de santé précise que la stérilisation par la vapeur d'eau saturée sous pression doit être la méthode appliquée lorsque les dispositifs le supportent.

3.3.1.3. Législation et normalisation de la stérilisation

Les procédés de stérilisation font l'objet d'importants travaux de normalisation, au niveau national et international (annexe 2) :

- **Normes internationales (ISO) :** ISO 17665-1 (vapeur, remplace ISO 11134), ISO 11135 (oxyde d'éthylène), ISO 11137 (irradiation), et ISO 11139 (vocabulaire).

La norme ISO spécifie les exigences relatives à l'équipement d'essai à utiliser pour s'assurer de la conformité des indicateurs chimiques et biologiques des procédés à la vapeur, à l'ETO, à la chaleur sèche et au peroxyde d'hydrogène gazeux. Ces exigences sont indiquées dans l'ISO 11140 relative aux indicateurs chimiques et dans l'ISO 11138 relative aux indicateurs biologiques. Ces normes fournissent également des méthodes informatives permettant de qualifier les performances des indicateurs biologiques et chimiques pour l'usage prévu et pour les essais de contrôle qualité de routine.

- **Normes française et européennes (AFNOR) :** EN 550 (oxyde d'éthylène), EN 552 (irradiation), et EN 554 (vapeur).

Pour les prestataires hospitaliers, les industriels fabriquant les biomatériaux, les fabricants réalisant la stérilisation, les prestataires de services, de nouvelles normes sont attendues dans les années à venir :

En avril 2009, la norme EN 552 (Stérilisation des dispositifs médicaux - Validation et contrôle de routine pour la stérilisation par irradiation) sera remplacée par les normes : NF EN ISO11137-1 (Stérilisation des produits de santé - Irradiation - Partie 1 : exigences relatives à la mise au point, à la validation et au contrôle de routine d'un procédé de stérilisation pour les dispositifs médicaux), NF EN ISO 11137-2 (Stérilisation des produits de santé - Irradiation - Partie 2 : établissement de la dose stérilisante), NF EN ISO 11137-3 : Stérilisation des produits de santé - Irradiation - Partie 3 : directives relatives aux aspects dosimétriques). La norme EN 554 (Stérilisation des dispositifs médicaux - Validation et contrôle de routine pour la stérilisation à la vapeur d'eau) sera remplacée par la norme NF EN 17665-1 (Stérilisation des produits de santé par chaleur humide).

En mai 2010, la norme EN 550 (Stérilisation des dispositifs médicaux - Validation et contrôle de routine pour la stérilisation à l'oxyde d'éthylène) sera remplacée par la norme NF EN IP11135-1 (Stérilisation des produits de santé, Oxyde d'éthylène, partie 1 : Exigences de développement, de validation et de contrôle de routine d'un processus de stérilisation pour des dispositifs médicaux).

3.3.2. Comment stériliser les dispositifs biomédicaux ?

Quatre acteurs sont responsables de la chaîne de stérilisation : les industriels (mise en conformité de ses matériels), les autorités compétentes (mise en place d'un référentiel d'évaluation), les établissements de santé (hôpitaux et cabinet dentaire), et les utilisateurs (le clinicien).

3.3.2.1. Méthodes de stérilisation à basse température par agents physiques

▪ Stérilisation aux radiations ionisantes

Ce procédé fait appel soit à des rayonnements électromagnétiques de grande énergie (rayons γ), soit à des rayonnements corpusculaires électroniques (rayons β). Dans tous les cas, il s'agit de rayonnements fortement ionisants pouvant arracher les électrons des atomes. **La radio-stérilisation est un procédé de stérilisation très fiable** : il n'utilise pas de gaz toxique ou corrosif, ni de vapeur, ni de chaleur. Il n'existe pas de radioactivité résiduelle du matériel stérilisé et ce système permet de traiter rapidement des quantités importantes d'objets. A

contrario, cette stérilisation est inefficace sur les prions. Malgré la **lourdeur des installations et l'opinion hostile à l'utilisation des rayonnements ionisants**, ce procédé de stérilisation se développe lentement et atteint une part de marché de 35 à 40% du matériel stérilisé aux USA et de 10 à 15% en France, où il continue sa croissance principalement sur le marché agro-alimentaire.

▪ **Stérilisation aux ultraviolets (UV)**

Les stérilisateur par UV ou par lumière pulsée sont des dispositifs qui génèrent des flashs de lumière intense grâce à des lampes à xénon. De fortes impulsions lumineuses créées par des tubes de décharge au xénon forment un flux élevé et suffisamment homogène dans un emballage transparent pour garantir la stérilisation de son contenu. La lumière pulsée permet une stérilisation grâce à ces effets photochimique et photothermique. L'effet photochimique est produit par les UV qui agissent sur certaines liaisons chimiques comme celle de l'ADN, sur certains micro-organismes ou des dispositifs médicaux par association des UV à du TiO_2 (Cho et coll. 2007, Kim et coll. 2007, Lee et coll. 2007b, Nakamura et coll. 2007). L'effet photothermique est lié à la production de rayonnement IR qui provoque une augmentation importante mais très brève de la température à la surface de l'échantillon entraînant ainsi l'éclatement des micro-organismes présents.

La stérilisation aux UV permet un traitement rapide et efficace sur beaucoup de micro-organismes en générant peu ou pas de résidus toxiques (Devine et coll. 2001). Ce procédé permet la stérilisation d'instruments médicaux, de produits pharmaceutiques, de l'eau mais aussi de produits alimentaires. Cependant, **cette technique n'est applicable qu'à la décontamination de surface ou de liquide clair pour lesquels la lumière peut avoir accès à tout le volume**. La stérilisation au travers d'emballage absorbant les UV ou bien de surfaces rugueuses (présence de zones d'ombre) est inefficace. La stérilisation par UV n'est pas une méthode acceptée comme fiable pour stériliser des dispositifs médicaux à usage clinique.

3.3.2.2. Méthodes de stérilisation à basse température par agents chimiques

L'efficacité des méthodes de stérilisation à basse température ou température ambiante par des agents chimiques est en cours d'évaluation (Brétagnot et coll. 2008, Deilmann et coll. 2008, Hauser et coll. 2008).

- **Stérilisation au formaldéhyde gazeux**

Le formaldéhyde gazeux est un agent de stérilisation en surface. Il ne pénètre pas en profondeur contrairement à l'oxyde d'éthylène. De plus, il est corrosif et sa désorption se poursuit après stérilisation.

- **Stérilisation à l'oxyde d'éthylène (ETO)**

L'ETO est un gaz obtenu par l'action de l'hydroxyde de potassium sur la monochlorhydrine de glycol. Cette molécule a une plus petite taille qu'une molécule d'eau ou de formaldéhyde. Ceci explique son pouvoir de pénétration important et sa grande efficacité à stériliser des objets complexes. Son pouvoir de pénétration au travers des parois ou *perméation* permet à l'ETO d'atteindre les principaux constituants de la matière vivante (ADN, protéines, vitamines, enzymes). Il est contre-indiqué pour la stérilisation des instruments médicaux thermosensibles réutilisables. En revanche, c'est un procédé de stérilisation reconnu et validé par la norme européenne EN 550 pour les dispositifs médicaux thermosensibles neufs à usage unique. Cette technique de stérilisation à basse température est l'une des principales méthodes pour la stérilisation des matériaux thermosensibles (Sobaszek et coll. 1999).

Quatre paramètres déterminent l'efficacité de la stérilisation à l'ETO : la concentration en oxyde d'éthylène (400 à 1000 mg/l), la durée de l'exposition (3 à 6h selon la contamination et la morphologie du dispositif), la température (50 à 60°C), et l'humidité (30 à 60 %). La stérilisation à l'ETO est **active contre tous les micro-organismes connus, sauf les prions pour lesquels l'efficacité est inconnue.**

Cette technique de stérilisation comporte cependant **un inconvénient majeur de part la toxicité et le caractère explosif de l'ETO**. L'ETO peut avoir des effets toxiques sur le personnel de stérilisation, ainsi que sur les patients et sur l'environnement. Aujourd'hui, les appareils de stérilisation à l'oxyde d'éthylène comprennent un programme de dégazage (48h minimum) qui permet la désorption immédiate après la stérilisation. Ainsi, le risque d'exposition pour le personnel est réduit de manière significative. Cependant, la stérilisation à l'ETO ne doit être en aucun cas réalisée sur des matériaux en matière plastique chlorée (PVC) à cause de la production d'oxychlorure d'éthyle toxique.

▪ **Stérilisation au gaz plasma**

Le plasma est un gaz ionisé. Il permet la production d'espèces actives qui n'existent pas dans le milieu naturel comme par exemple la formation d'atomes d'oxygène à partir de l'oxygène moléculaire de l'air. Le principe repose sur l'action des atomes d'oxygène associée à celle des rayonnements UV à température ambiante (~27°C). L'action combinée des vapeurs d'acide peracétique à une phase plasma de mélange gazeux composé d'hydrogène, d'oxygène et d'argon déclenche la stérilisation.

Elle représente très certainement une voie prometteuse dans les techniques de stérilisation des dispositifs médicaux hydro et/ou thermosensibles. De nombreux programmes de recherche s'intéressent à cette nouvelle méthode de stérilisation par plasma froid (Moisan et coll. 2001, Monna et coll. 2002, Lakhssassi et coll. 2006).

La stérilisation s'effectue à température ambiante pour des cycles de 75 mins à plusieurs heures. Cette faible chaleur pourrait séduire beaucoup d'industriels pour la stérilisation d'implants dentaires traités en surface (ex : le revêtement d'hydroxyapatite). Les risques toxiques liés à l'emploi de l'acide peracétique doivent être pris en compte, même si toutes les précautions sont prévues pour éviter ce type de problèmes.

Trois actions peuvent être décrites : destruction du matériel génétique des bactéries par rayonnement UV, érosion des micro-organismes (photo-destruction par UV), et gravure des micro-organismes (par les atomes d'oxygène) (Lakhssassi

et coll. 2006). Ce procédé reste néanmoins très coûteux. Il est efficace pour stériliser le nylon, le latex, le matériel électronique ou optique, les dispositifs en caoutchouc naturel, en polyester, en polystyrène, ou encore en polysulfone.

3.3.2.3. Méthodes de stérilisation à haute température

▪ Stérilisation à la chaleur sèche : le Poupinel

Cette méthode fait appel à la chaleur produite par une source électrique. Elle nécessite des hautes températures et des cycles longs. Son efficacité dépend donc de la puissance de l'appareil, et de la présence d'un système visant à assurer une distribution égale et rapide de la chaleur à l'intérieur de la chambre. L'état stérile est obtenu par dégradation des protéines des germes par oxydation. L'air étant un très mauvais conducteur de la chaleur, la disposition des charges à stériliser demande une grande rigueur.

Une parfaite disposition des charges est très difficile à assurer. Cela peut entraîner une absence d'homogénéité de température à l'intérieur de l'enceinte, ainsi qu'une différence notable de température entre le contenant et le contenu à stériliser. Bien que la stérilisation à la chaleur sèche soit une méthode économique et non toxique, **les nombreux échecs reconnus et la faible fiabilité de ce procédé a conduit à son abandon** (Circulaire DGS/5 C/DHOS/E 2 n°2001-138 du 14 mars 2001).

▪ Stérilisation à la chaleur humide : l'autoclave

La vapeur d'eau est un agent stérilisant car l'humidité et la chaleur dénaturent les protéines des micro-organismes par hydrolyse. La plupart des micro-organismes sont rapidement détruits à partir de 80°C mais la destruction totale des spores nécessite des températures plus élevées. En l'état des connaissances actuelles, pour inactiver physiquement les prions (ATNC), il faut utiliser la vapeur d'eau par autoclavage à 134°C pendant 18 mins : c'est le cycle *prion*. Pour que la vapeur d'eau atteigne la température de 134°C dans l'autoclave, l'air contenu dans la cuve doit être remplacé à 100 % par de la vapeur d'eau. Cette opération est réalisée par une succession de vides et d'injections de vapeur (vide fractionné) jusqu'à une pression d'environ 2 bars. Ceci permet d'obtenir de la vapeur d'eau de moins en moins mélangée à l'air résiduel (Galtier 1996).

La stérilisation à la chaleur humide au moyen de vapeur saturée et sous pression constitue **le procédé de stérilisation le plus fiable et le plus facile à contrôler** (Mahé 1998) et reste la méthode de prédilection pour le matériel qui résiste aux températures élevées, aux changements de pression, et à l'humidité.

Ce procédé est le seul reconnu en terme de stérilisation efficace des biomatériaux et des dispositifs thérapeutiques utilisés dans le domaine biomédical.

III. RECHERCHES EXPERIMENTALES

« Il n'y a pas de recherches fondamentales et de recherches appliquées, il n'y a que la Science et les applications de la Science, reliées l'une à l'autre comme un arbre à ses fruits ».

Louis Pasteur (1822-1895)

1. Objectifs

L'optimisation des états de surface fait l'objet d'une attention toute particulière pour améliorer la biointégration et la pérennité des dispositifs en Ti et en alliage NiTi dans l'écosystème buccal. *De facto*, la notion d'interface et l'étude des états de surface pour les biomatériaux en Odontologie sont fondamentales. La recherche d'un meilleur état de surface est une quête quotidienne pour les chercheurs, les cliniciens, et les industriels afin d'optimiser la bio-intégration de ces biomatériaux endo-buccaux. A titre d'exemple, nous pouvons citer les implants dentaires (en Ti) dont le but serait de les rendre fonctionnels plus précocement, les instruments endodontiques (en NiTi), ou encore les arcs orthodontiques (en NiTi), qui outre leur action mécanique, pourraient être apprêtés d'une propriétés antibactérienne.

Depuis une dizaine d'année, les revêtements de polyelectrolytes sont étudiés pour les possibilités qu'ils donnent en terme de fonctionnalisation et d'ingénierie tissulaire. En effet, leur méthode d'assemblage à basse température permet d'insérer au cœur de ces films des molécules d'intérêt (médicamenteuses, protéiques, ou peptidiques) susceptibles d'interagir avec le milieu environnant. Ces récentes études *in situ* réalisées sur les FMP ont inspiré ce travail pour modifier et améliorer la surface de ces biomatériaux métalliques.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les FMP fonctionnalisés sur du Ti et du NiTi. Les recherches expérimentales proposaient en premier lieu de sélectionner les films pouvant être déposés sur ces biomatériaux, qui plus est ceux engendrant une réponse cellulaire favorable avec des fibroblastes gingivaux humains. Dans un deuxième temps, la couche précurseur des FMP à base de PEI a été étudiée en terme de biocompatibilité cellulaire. Dans un troisième et dernier temps, des essais de stérilisation ont été réalisés afin de tester l'influence d'un tel procédé sur ces FMP.

2. Matériel

2.1. Echantillons métalliques

2.1.1. Echantillons en Ti et en NiTi

Les échantillons en Ti ont été fournis, usinés et certifiés conforme par la société *Timet Savoie* (Titanium Métaux Corporation, Ugine, France) (annexe 3). Ils étaient en $TiCp_{40}$ de grade I (annexe 4). Les échantillons avaient une forme carrée de 1,1 cm de côté et une épaisseur de 1 mm.

Les échantillons en NiTi ont été fournis, usinés et certifiés conforme par la société *AMF* (Alliage à Mémoire de Forme, Lury sur Arnon, France) (annexe 3). L'alliage était composé de 55,4% de Ni, 44,5 % de Ti, 0,1% d'O₂, 0.002% de Fe, et 0.002% de Cu (annexe 4). Les échantillons avaient une forme carrée de 0,6 cm de côté et une épaisseur de 2 mm.

2.1.2. Traitement de surface avant dépôt des polyélectrolytes

Un polissage de surface a été réalisé manuellement avec des disques abrasifs de grain P600 (Buehler® Sic Grinding Paper) à $Ra=0,3 \mu m$ (fig.9). Notons la particularité du polissage pour les analyses en tensiométrie : les stries de polissage devaient être les plus parallèles au bord de l'échantillon et unidirectionnelles sur les deux faces de l'échantillon afin d'éviter toute dispersion des valeurs de mesure.



Figure 9 : Echantillon en titane nu en MEB (x400).

Un nettoyage-dégraissage a été ultérieurement effectué par une succession de bains ultrasoniques afin d'éliminer toute impureté résiduelle de surface : 10 mins avec de l'acétone puis rinçage abondant à l'eau ultra-pure (18,2 M Ω .cm), 10 mins avec de l'éthanol, puis rinçage abondant à l'eau ultra-pure, et 10 mins avec de l'eau ultra-pure.

Après séchage à la soufflette azotée, les échantillons étaient prêts pour le dépôt des FMP.

2.1.3. Recyclage des échantillons

Pour confirmer certains résultats, des échantillons ont été recyclés de la manière suivante : re-polissage (nettoyage mécanique) et re-nettoyage (nettoyage chimique) selon la méthode décrite préalablement.

2.2. Polyélectrolytes et films multicouches

2.2.1. La base précurseur : la polyéthylèneimine (PEI)

2.2.1.1. Préparation de la PEI

La PEI (PM=70 kDa, 50% dans l'eau) a été fournie par Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, Etats-Unis). La PEI est un fluide incolore et visqueux qui se dilue assez facilement dans l'eau. La dilution se faisait suivant un rapport de 10 mg de PEI (à 50% d'eau) pour 1 ml de solution de NaCl (0,15 M ; pH6,5) préparée avec de l'eau ultra-pure et filtrée. La PEI avait une concentration finale de 5 mg/ml.

2.2.1.2. Dépôt de la PEI

400 μ l de solution ont été déposés sur les échantillons pendant 10 mins. La solution a été ensuite pipetée et les échantillons ont été rincés avec une solution de NaCl (0,15 M) non filtrée deux fois de suite pendant 3 mins.

2.2.2. Les polyélectrolytes

2.2.2.1. Présentation des polyélectrolytes

Les films ont été construits à partir de polycations et de polyanions (références commerciales en annexe 5) :

➤ Les polycations (tabl.5)

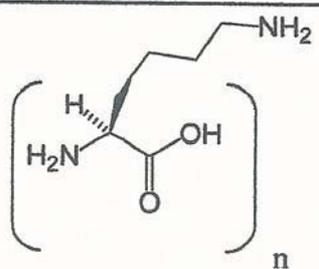
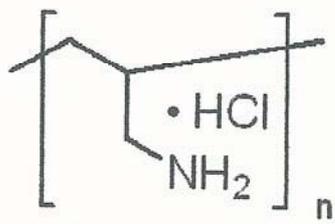
Nom	PLL	PAH
Terminologie	Poly-L-Lysine	Poly-Allylamine Hydrochloride
PM en kDa	30	70
Formule monomérique		

Tableau 5 : Les polycations (nom, abréviation, PM, et formule monomérique).

➤ Les polyanions (tabl.6)

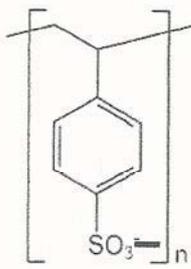
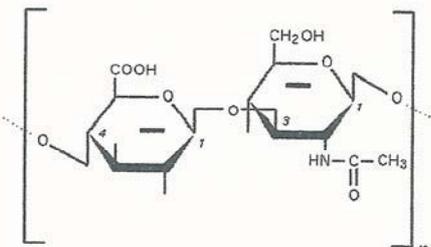
Nom	PSS	HA
Terminologie	Poly-Sodium-4-Styrène Sulfonate	Hyaluronane ou Acide Hyaluronique
PM en kDa	70	400
Formule monomérique		

Tableau 6 : Les polyanions (nom, abréviation, PM, et formule monomérique).

2.2.2.2. Préparation des polyélectrolytes

- PSS à 5 mg/ml de solution de NaCl filtrée,
- PAH à 5 mg/ml de solution de NaCl filtrée,
- PLL à 1 mg/ml de solution de NaCl filtrée,
- HA à 1 mg/ml de solution de NaCl filtrée.

La solution de NaCl devait avoir un pH de 6,5 et une concentration à 0,15 M (car le pH et la concentration de la solution de NaCl peut influencer la qualité et

l'épaisseur des films). Une solution de NaCl non filtrée a été préparée pour les rinçages successifs des échantillons lors de la fabrication des films.

2.2.3. Les films multicouches de polyélectrolytes (FMP)

2.2.3.1. Présentation des FMP

Le choix et la sélection des FMP se référaient à différentes études publiées sur les FMP (cf : II. Recherches bibliographiques), à un travail de DEA réalisé par Lotfi Mahmdi en 2003, et à notre travail de DEA effectué en 2004.

Deux types de films ont été étudiés : les films à base de PSS/PAH, et les films à base de HA/PLL réticulés par voie chimique. Ces deux catégories de films étaient de nature, de rugosité, de charge, et d'épaisseur différentes.

2.2.3.2. Préparation des FMP

Après adsorption de la PEI à la surface des échantillons puis rinçage avec une solution de NaCl non filtrée, un dépôt alterné d'un polyanion (400 μ l) et d'un polycation (400 μ l) a été réalisé pendant 10 mins chacun, jusqu'à la formation complète du FMP (fig.10). Entre chaque polyélectrolyte déposé (polyanion ou polycation), deux rinçages de 3 mins ont été réalisés avec une solution de NaCl non filtrée. Les polyélectrolytes physisorbés dépendaient du film à construire.

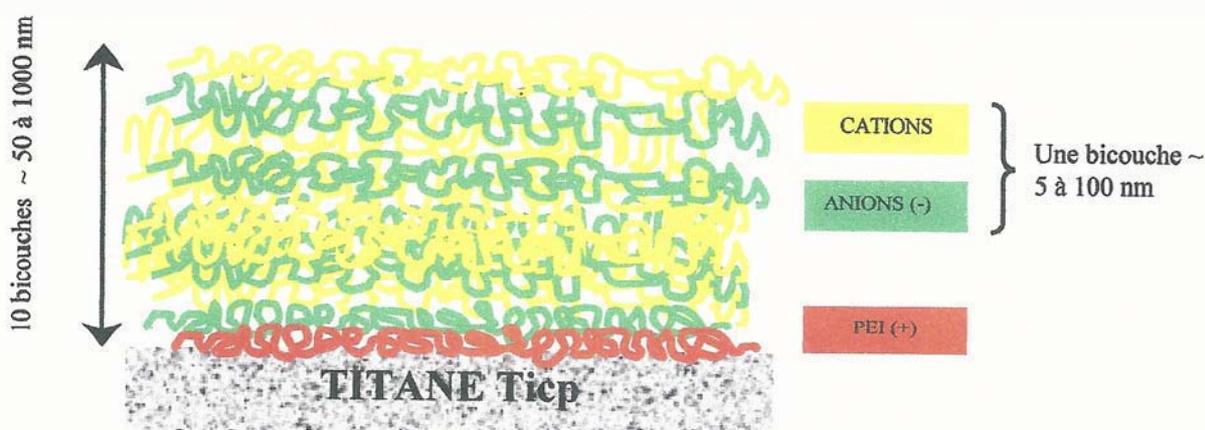


Figure 10 : Schéma d'un FMP à base de PEI sur du Ti.

2.2.3.3. Réticulation chimique des FMP

Nous avons choisi de réticuler chimiquement les films à base de HA/PLL dans le but d'optimiser la réponse cellulaire qui ne semblait pas concluante sur ces mêmes films dans le travail de Mahmdi en 2003.

Cette réticulation a été réalisée après la construction des films avec une solution de N-diméthylaminopropyl-éthylcarbodiimide (EDC) à 35 mg/ml de NaCl (0,15 M ; pH5) et de N-Hydroxy-Sulfosuccinimide (NHS) à 5,5 mg/ml de NaCl (0,15 M ; pH5) (références commerciales en annexe 5).

Le mélange des deux produits a été effectué au dernier moment avant d'en déposer 500 µl dans chaque puits. Le temps de réticulation a été de 12h minimum. Deux rinçages successifs de 30 mins avec une solution de NaCl non filtrée (0,15 M ; pH6,5) ont été réalisés par la suite.

3. Méthodes

3.1. Méthodes de fabrication des FMP

Deux méthodes de fabrication différentes ont été utilisées, la fabrication robotisée et la fabrication manuelle. Cependant, le principe reste identique.

3.1.1. Fabrication robotisée

La fabrication robotisée a été réalisée avec des portoirs en téflon spécialement usinés et ajustés à la taille des échantillons pour éviter tout contact des surfaces (fig.11a).



Figure 11 : Stockage des échantillons.
11a- Portoirs usinés en téflon, 11b- Boîtes de Pétri 48 puits.

Le stockage des échantillons a été fait dans des boîtes de Pétri 48 puits (Greiner Bio-one, France) pour éviter également tout contact des surfaces fonctionnalisées (fig.11b). Ces boîtes avaient pour avantage de pouvoir conserver les échantillons dans une solution de NaCl pendant plusieurs semaines à température ambiante.

Les trempages/rinçages ont été exécutés automatiquement dans des petits pots en polystyrène grâce à un robot (Dipping robot DR3 Kirstein GmbH, Germany) à l'Ecole Européenne de Chimie, Polymères, et Matériaux (ECPM, Inserm U595, Faculté de Médecine, Strasbourg). Chaque programmation permettait de paramétrer les temps de trempage/rinçage et durait environ 6h pour obtenir la construction de 8 films (2 portoirs x 4 échantillons) (fig.12).

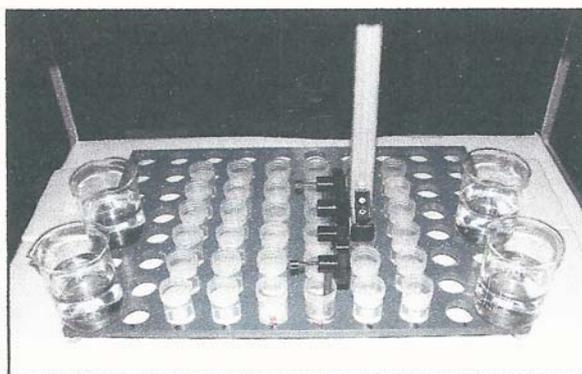


Figure 12 : Robot automatique (Dipping robot DR3 Kirstein).

3.1.2. Fabrication manuelle

Les échantillons étaient disposés dans des boîtes de Pétri 24 puits. Le principe reposait sur des pipetages successifs et alternés des solutions de polyélectrolytes (polyanionique ou polycationique) et des solutions de rinçage.

3.2. Méthodes de caractérisation des surfaces fonctionnalisées par des FMP

3.2.1. Test de rugosité des substrats métalliques sans FMP

Un test de rugosité a été réalisé avec le profilomètre Perthometer C5D (Perthen) afin de contrôler la valeur du Ra avant dépôt des polyélectrolytes. 5

mesures successives du centre vers le bord ont été effectuées sur 7 échantillons puis une moyenne a été calculée.

3.2.2. Tensiométrie

Les mesures de tensiométrie ont été réalisées avec un tensiomètre 3S de GBX-Instruments (fig.13). Ces analyses ont nécessité de réaliser une adsorption des FMP sur les deux faces de chaque échantillon testé grâce à la fabrication robotisée.



Figure 13 : Tensiomètre 3S de GBX Instruments.

Le principe de mesure se base sur la force qui s'exerce à la surface de l'échantillon plongeant dans un liquide grâce à une balance de pesée à laquelle est accrochée l'échantillon. A partir de la courbe pesée-profondeur d'immersion-émersion, un logiciel spécial traite les données et calcule les angles de contact pour chaque cycle d'immersion-émersion.

Les mesures ont été conduites dans trois liquides sondes différents : l'eau pure (polaire), le diiodométhane (apolaire), et le formamide (polaire).

Certains paramètres ont été réglés préalablement :

- Vitesse de détection : 100 $\mu\text{m/s}$ (déplacement vertical avant contact).
- Vitesse de mesure : 50 $\mu\text{m/s}$ (déplacement vertical dans le liquide).
- Profondeur d'immersion : 7 mm.
- Seuil de détection : 5 mg (masse considérant le contact).

- Mesures successives : 5 cycles par échantillon.
- Circonférence de l'échantillon : 24 mm (ex Ti : $(2 \times 11) + (2 \times 1) = 24$ mm).
- Température : 20°C.

Les échantillons pourvus des FMP et stockés dans des boîtes de Pétri ont été préparés pour la tensiométrie selon le protocole suivant :

- Eviction de l'échantillon conservé dans la solution de NaCl,
- Rinçage à l'eau ultra-pure,
- Trempage 30 mins dans l'eau ultra-pure (élimination des traces de sel),
- Séchage à la soufflette azotée,
- Séchage à l'étuve pendant 2h à 30°C.

Les angles de contact et les hystéréses ont été directement obtenus à partir du logiciel Tensiomètre Balance 3S GBX . Le calcul des énergies de surfaces et des composantes acide, base et acido-basique ont été calculés avec le logiciel Windrop. L'énergie de surface, les composantes acides, basiques et acido-basiques, ainsi que la composante dispersive, ont été calculées à partir des mesures obtenues de θ_a au premier cycle dans les trois liquides sondes.

3.2.3. Microscopie à force atomique (AFM)

Les manipulations en AFM ont été réalisées en collaboration avec le Pr Catherine Picart. Les observations en AFM ont été réalisées en milieu sec sur un appareil Nanoscope IV de Digital Instruments (Santa Barbara, CA) auquel était relié un logiciel spécial d'acquisition d'images.

Des cantilevers (constante de raideur de 0,03 N/m) avec des pointes en nitrure de silicium ont été utilisés. Plusieurs balayages ont été réalisés sur une zone donnée (centre et bord de l'échantillon étudié). Les images en mode déflexion et en mode hauteur ont été acquises simultanément à une vitesse de balayage ou *scan rate* de 2 Hz de fréquence avec une résolution de 512 x 512 pixels.

3.2.4. Microscopie confocale

Les manipulations en microscopie confocale ont été également réalisées en collaboration avec le Pr Catherine Picart. Le microscope confocal Zeiss LSM510 est un microscope constitué d'une source laser monochromatique excitant des fluorochromes et d'un système de balayage de surface. Ce dispositif de microscopie photonique permet d'acquérir des coupes confocales successives sans détruire l'objet. Les observations ont été réalisées à un objectif de 40 en zoom 5 sur les films PEI-(HA/PLL)₁₀ construits avec du PLL-FITC fluorescent (Sigma) (référence commerciale en annexe 5).

3.3. Cultures cellulaires et études biologiques

L'étude biologique a été menée avec des fibroblastes gingivaux humains et des ostéoblastes humains de lignée MG-63 pour mimer le contact direct et intime d'un biomatériau dentaire avec les tissus gingivo-osseux environnant.

3.3.1. Cultures cellulaires

3.3.1.1. Les cellules fibroblastiques

▪ Prélèvement des cellules fibroblastiques

Les fibroblastes humains ont été obtenus par la technique des explants (Tsutsui 1973). Après consentement du patient, les prélèvements ont été réalisés à partir de sacs péri-coronaires sains durant une extraction de dent de sagesse aux Hospices Civils de Lyon (Service d'Odontologie, Département de Chirurgie Buccale, CHU de Lyon). La biopsie a été conservée après prélèvement dans 100 ml de milieu de culture essentiel d'Eagle (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) (Eurobio Lesulis, France) additionné d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (P/S) à 100 U/ml et Fungizone (F) à 250 µg/ml (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier).

▪ Culture primaire des cellules fibroblastiques

Plusieurs rinçages du prélèvement ont été réalisés avec un tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Salin*, PBS) (Eurobio) et un mélange de P/S. Le prélèvement a été découpé pour obtenir des fragments de 2 mm³ sur lesquels 1 ml de milieu de culture a été ajouté dans une boîte de Pétri puis rejeté avant de

déposer les explants à la surface des boîtes de culture. Ces derniers ont adhéré pendant 30 mins sur le support puis du milieu de culture complet (DMEM + P/S + F + 10% Sérum de Veau Foetal (SVF, Eurobio)) a été déposé goutte à goutte pour les recouvrir au $\frac{3}{4}$. Leur incubation a été faite dans une étuve à 37°C dans une atmosphère humide saturée à 5% de CO₂, et le changement des milieux a été effectué tous les 2 jours jusqu'à confluence cellulaire.

▪ Culture secondaire des cellules fibroblastiques

Après confluence des cultures primaires, des cultures secondaires ont été réalisées avec 7 à 8 passages par lignée cellulaire. Un rinçage des cultures primaires a été effectué avec du PBS et un mélange P/S puis une trypsination-EDTA (Trypsine à 0,05% et Acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique à 0,02%, Eurobio) a permis de détacher et dissocier les couches cellulaires. Les études biologiques ont été réalisées à partir de ces cultures secondaires.

3.3.1.2. Les cellules ostéoblastiques

Les cellules ostéoblastiques ont été sélectionnées à partir de lignées cellulaires humaines de type MG-63. Ces cellules sont immortalisées à partir de tumeurs osseuses (ostéosarcomes humains) et présentent l'intérêt d'avoir des caractéristiques homogènes, d'avoir un fort potentiel mitogénique stable dans le temps, et de conserver des caractéristiques ostéoblastiques.

Ces cellules ont été entretenues dans des flasquettes avec du milieu de culture complet comprenant du milieu nutritif DMEM (100 ml), un facteur de croissance (SVF à 10%), un antifongique (F 250 µg/ml) et des antibiotiques (P/S à 100 U/ml). Les boîtes de cultures ont été placées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide et enrichie en CO₂ (5%). Lorsque les cellules étaient à confluence, le tapis cellulaire a été rincé avec du PBS puis dissocié par l'action d'une solution de trypsine (0,05%) et d'EDTA (0,02%).

3.3.2. Etudes biologiques

L'étude biologique a permis d'étudier la morphologie, l'adhésion, et la prolifération cellulaire. Deux méthodes ont été utilisées : la microscopie électronique à balayage et le test colorimétrique de Mosmann ou *test MTT*

(Mosmann 1983). L'étude biologique a été réalisée à 2h d'adhésion le premier jour (J0), au 2^{ème} jour (J2), au 4^{ème} jour (J4), et au 7^{ème} jour (J7) de culture.

3.3.2.1. *Ensemencement*

Les échantillons pourvus des FMP et les échantillons témoins ont été rincés dans de l'eau ultra-pure pendant 1h afin d'éliminer les traces de sel, séchés à la soufflette azotée, puis disposés dans des boîtes de Pétri 24 puits stériles destinées à la culture cellulaire. Ces boîtes ont été mises ensuite sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 254 nm pendant 15 mins afin d'assurer leur stérilisation avant la mise en culture.

Pour chaque manipulation, un comptage des cellules a été réalisé avec le compteur de cellules Z1 (Beckman Coulter, Fufferton-Angleterre) puis ajusté à la concentration choisie de $12-15 \times 10^3$ cellules/cm² avant ensemencement. 100 µl de suspension cellulaire ont été déposés sur chaque échantillon. Les échantillons en Ti avaient une surface de 1,21 cm² donnant une concentration d'ensemencement entre 14500-18150 cellules. Les échantillons en NiTi avaient une surface de 0,36 cm² donnant une concentration d'ensemencement sur chaque échantillon entre 4320-5400 cellules. Après 2h d'adhésion, 1ml de milieu DMEM complet a été ajouté dans chaque puits.

3.3.2.2. *Microscopie Electronique à Balayage (MEB)*

L'observation des échantillons a été faite au Centre Technologique des Microstructures (CTM, Université Claude Bernard Lyon1, France) sur un microscope Hitachi S800 (Tokyo, Japan) après pulvérisation cathodique (Balzers) pendant 2mins 30s sous vide (0,1 Mbar) sous un courant de 25mA.

L'observation morphologique en MEB a été réalisée à chaque temps de culture (J0, J2, J4 et J7) pour lesquels les échantillons ont été préparés suivant le protocole décrit ci-dessous avant observation :

- Rinçage rapide avec une solution de PBS (pH 7,2),
- Fixation 30 mins à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde (COH-CH₂-COH) à 25% tamponnée avec une solution de cacodylate de sodium (CaCo) à 0,4M, rinçage 30 mins au CaCo (0,2M),

- Post-fixation 30 mins à 4°C avec une solution de tétraoxyde d'osmium OsO₄ (1%) additionnée d'un tampon de CaCo (0,2M), rinçage à l'eau distillée,
- Déshydratation dans des bains alcoolisés de concentration croissante pendant 5 mins : 30°, 50°, 70°, 90° et 100°. Dessiccation avec un mélange alcool (100°)-fréon (vol/vol), fréon 5 mins puis laisser évaporer.
- Fixation des échantillons sur les portes objets (scotch double face), séchage à l'étuve pendant 1h,
- Métallisation des échantillons à l'or-palladium.

3.3.2.3. Méthode de Mosmann (test MTT)

Ce test d'activité et de prolifération cellulaire est un dosage colorimétrique. Les cellules vivantes ont une activité enzymatique mitochondriale qui transforme le MTT (Méthythiozol Tétrazolium jaune, Sigma Aldrich) en cristaux de formazan de couleur bleue grâce à la succinate déshydrogénase. La valeur de la densité optique (DO) est proportionnelle à l'activité cellulaire et permet d'évaluer quantitativement leur viabilité signe de leur prolifération.

- Une solution de MTT (3(4,5-diméthylthiozol)-2,5 diphényl-tétrazoliumbromide) (Sigma Aldrich) à 5mg/ml en tampon PBS à pH 7,2 a été préparée, filtrée (0,22 µm), et conservée à l'obscurité à 4°C. Puis :
- Ajout de 50 µl de MTT dans 1ml de milieu de culture dans chacun des puits de la boîte à Pétri. Ne pas changer le milieu de culture avant l'ajout du MTT pour éviter toute précipitation.
- Incubation pendant 4h (37°C, 5% de CO₂).
- Révélation colorimétrique : enlever le milieu, mettre 500 µl de mélange éthanol absolu/DMSO (diméthyl sulfoxyde, Amresco, USA) (vol/vol) puis agiter pendant 5 mins.
- Lecture des résultats : mettre 200 µl de la suspension dans les puits d'une plaque spectro 96 puits (Microtest III, BD Biosciences-France).

La lecture de la DO a été réalisée à une longueur d'onde de 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre automatique Microplate Reader EL308 (Bio-tek Instrument, USA). Deux *puits blanc* (puits sans cellules ayant subi le même protocole expérimental) a été pris comme référence de DO.

3.4. Méthodes de stérilisation et caractérisation des surfaces stérilisées

Les substrats étudiés sont du Ti et du NiTi fonctionnalisés par des films (PSS/PAH)₅.

3.4.1. Procédés de stérilisation

Trois méthodes différentes ont été retenues pour stériliser les échantillons : la stérilisation par UV, par autoclave, et par vapeur d'oxyde d'éthylène.

3.4.1.1. Stérilisation par ultraviolet (UV)

Les échantillons ont été placés dans une boîte de Pétri 24 puits avec un couvercle hermétiquement fermé avec du ruban plastifié autoadhésif. L'exposition à la lumière s'effectuait grâce à une lampe ultra violette (UVA 100-200 HPV, honle UV technology, 1000W) avec une longueur d'onde de 254 nm et un temps d'exposition de 10 mins.

3.4.1.2. Stérilisation par autoclave (AC)

Les échantillons ont été conditionnés dans des boîtes en verre, munies d'un couvercle non étanche et emballées non hermétiquement sous papier aluminium, afin de laisser pénétrer la vapeur d'eau. Ce conditionnement distinctif a été choisi car le plastique des boîtes de Pétri ne résiste pas à l'autoclave. La stérilisation a été effectuée selon le cycle prion standard (18 mins, 134°C) dans un autoclave Technic Labo.

3.4.1.3. Stérilisation par vapeur d'oxyde d'éthylène (ETO)

Les échantillons ont été placés dans une boîte de Pétri 24 puits sans couvercle afin de permettre les échanges gazeux lors du procédé de stérilisation. La boîte a été ensachée dans un double emballage compatible avec une stérilisation par ETO et stérilisée par la société Sterigenics (St Romain, Anse, France). Un dégazage a été nécessaire pendant 48h dans une salle cloisonnée et étanche afin de laisser les résidus de gaz s'échapper des échantillons.

3.4.2. Test d'efficacité des procédés de stérilisation

Un contrôle qualité a été réalisé en collaboration avec M^{me} Dominique Décorêt, par une mise en culture des échantillons dans un bouillon de Schaedler (Bio-Mérieux, France) après stérilisation. Ce bouillon est une solution claire qui permet la culture des bactéries anaérobies communément rencontrées dans les pathologies humaines et animales. Le bouillon de Schaedler permet une analyse bactériologique. Il se compose de peptone trypticase soja (10 g/L), de peptone (5 g/L), d'extrait de levure (5 g/L), de chlorhydrate de cystéine (0,4 g/L), d'héline (0,01 g/L), de glucose (5 g/L), de tampon TRIS (0,75 g/L ; pH7,6).

La solution a été préparée par dissolution de 28,4 g/L de bouillon de Schaedler dans 1L d'eau pure. Cette solution a été répartie dans des tubes de 13 mL. Les tubes ont été ensuite autoclavés (18 mins, 134°C). Les échantillons ont étéensemencés d'une souche bactérienne de *Streptococcus mutans* cultivée dans un milieu contenant 5% sang défibriné de mouton sous atmosphère enrichie en CO₂. Les échantillons préalablement préparés ont été repartis dans les tubes qui ont été eux-mêmes placés en étuve à 37°C. Le contrôle de la multiplication bactérienne a été réalisé les jours suivants (liquide clair ou trouble selon l'existence d'une contamination bactérienne).

3.4.3. Caractérisation physico-chimique des FMP après stérilisation

3.4.3.1. Spectrométrie FTIR

L'intégrité des revêtements post-stérilisation est en cours d'évaluation avec une méthode en FTIR à angle rasant en collaboration avec Mr Bernard Beaugiraud. L'analyse est réalisée au moyen d'un spectrophotomètre FTIR (Perkin-Elmer, USA) en mode Réflexion Absorption IR Spectra (RAIRS) avec une incidence de 6° et une gamme spectrale de 4000 à 400 cm⁻¹. Les longueurs d'ondes sont balayées entre 4000 et à 400 cm⁻¹ au pas de 4 cm⁻¹ avec une résolution de 1 cm⁻¹. Les échantillons sont appliqués avec une force calibrée contre le cristal afin d'assurer un contact maximal entre l'échantillon et le diamant. Plusieurs acquisitions sont accumulées par point pour limiter le bruit de fond, et le background est pris sur l'atmosphère. Des bandes d'absorption caractérisent les polyélectrolytes et les différents groupements chimiques.

3.4.3.2. Spectroscopie Raman

L'étude par spectroscopie Raman est en cours de réalisation en collaboration avec Mr Arnaud Brioude. Le spectromètre utilisé est le Raman ARAMIS. La résolution spectrale est réglée à une longueur d'onde de 632,8 nm et une puissance de 8 mW.

3.5. Analyse statistique des résultats

Les données recueillies concernant les tests de rugosité, la tensiométrie, et les test MTT ont été traitées à l'aide du logiciel Excel version Microsoft 2000.

Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel Statview version 5.0 (SAS Institute Inc Cary, NC–USA). Le test statistique utilisé est le test de *Student* des séries non-appariées, appelé *Test t non-apparié*. La valeur du coefficient de corrélation Pearson noté p indique le niveau de signification des statistiques. Selon la valeur de ce p , la différence statistique est ou n'est pas significative :

- Si $p > 0,05$, la différence statistique est dite non significative.
- Si $p < 0,05$, la différence statistique est significative.
- Si $p < 0,01$, la différence statistique est très significative.
- Si $p < 0,001$, la différence statistique est hautement significative.

La puissance du *Test t non-apparié* a permis d'obtenir des résultats statistiquement valables avec un seuil de tolérance à 5%.

4. Résultats

4.1. FMP sur titane et réponse cellulaire

Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium

C. Brunot^{a,b}, B. Grosogeat^{a,b}, C. Picart^c, C. Lagneau^a, N. Jaffrezic-Renault^d, et L. Ponsonnet^e

^aLaboratoire des Multimatériaux et des Interfaces, UMR CNRS 5615, Faculté d'Odontologie, Université de Lyon, Université Lyon 1, Rue Guillaume Paradin F-69372 Lyon Cedex 08, France

^bHospices Civils de Lyon, SCTD, place Depéret, F-69365 Lyon Cedex 07, France

^cLaboratoire de Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires, CNRS UMR 5235, Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 05, France

^dLaboratoire des Sciences Analytiques UMR CNRS 5180, Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne Cedex

^eLaboratoire Polymères Biopolymères Membranes, CNRS UMR 6522, Université de Rouen, Bd Maurice de Broglie F-76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

Article publié dans *Dent Mater* 2008,24(8):1025-35.

Mots clés français :

Titane (Ti), films multicouches de polyélectrolytes, tensiométrie, angles de contact, microscopie à force atomique, microscopie confocale, fibroblastes, culture cellulaire.

4.1.1. Contexte du travail

Une étude bibliographique a montré que la notion d'interface et l'étude des états de surface sont fondamentales pour ces biomatériaux utilisés en Odontologie. Des traitements de surface permettent de modifier les propriétés physico-chimiques afin d'améliorer la réponse cellulaire et d'optimiser la bio-intégration du Ti en terme de qualité et de temps.

D'autres voies de recherche s'ouvrent aujourd'hui, notamment en recouvrant la surface du Ti avec des produits biologiques bioactifs (peptides, collagène, protéines d'adhésion). Des études *in situ* ont montré que des polyélectrolytes pouvaient recouvrir certaines surfaces comme le verre ou le plastique sous forme de FMP (Picart et coll. 2001, Ai et coll. 2003, Bourra et coll. 2003, Vautier et coll. 2003). Les FMP apparaissent une voie originale de

modification biologique des surfaces pour les implants dentaires (Schaaf et Voegel 2002).

Ces travaux de recherches ont été initiés et menés dans la continuité des travaux de Lotfi Mahmdi réalisés au cours d'un DEA en 2003 intitulé « *Etude des propriétés de surface de films multicouches de polyélectrolytes et corrélation avec le comportement de fibroblastes gingivaux humains* ». De ce travail réalisé sur un substrat en verre lisse avec 6 types de films différents, en ressortait que les fibroblastes proliféraient plus favorablement sur les films PEI-(PSS/PAH)₁₀ que sur les films PEI-(HA/PLL)₅. La construction de FMP sur du Ti nous est apparue intéressante dans la mesure où une éventuelle application clinique en implantologie dentaire pourrait être envisagée. Les résultats de ces recherches sont l'aboutissement de notre travail de DEA intitulé « *Films multicouches de polyélectrolytes su titane et réponse cellulaire* » réalisé en 2004.

4.1.2. Synthèse détaillée de la recherche expérimentale

L'originalité de ce travail repose sur la construction de FMP sur un biomatériau métallique, en l'occurrence le Ticp. L'objectif de ce travail était double : nous cherchions d'une part à montrer que des FMP pouvaient effectivement se déposer sur le Ti, et d'autre part à étudier l'adhésion et la prolifération sur ces films. Le choix d'augmenter le nombre de bicouches à 10 bicouches et de réticuler chimiquement les films à base de HA/PLL avait pour but d'optimiser la réponse cellulaire qui ne semblait pas concluante dans le travail de Mahmdi sur ces mêmes genres de films (Mahmdi et coll. 2006).

L'étude expérimentale a été menée sur des échantillons en Ticp avec une rugosité de surface initiale et contrôlée Ra = 0,3 µm. Deux types de FMP ont été construits avec une couche précurseur à base de PEI. Deux films étaient à base de PSS et de PAH, et deux autres à base de HA et de PLL : PEI-(PSS/PAH)₁₀ et PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS, PEI-(HA/PLL)₁₀ et PEI-(HA/PLL)₁₀-HA, ces deux derniers films étant réticulés chimiquement. Une analyse des caractères physico-chimiques des surfaces a été réalisée par tensiométrie, microscopie à force atomique, et microscopie confocale. Une étude biologique avec des fibroblastes gingivaux humains a été menée à J0 (2h d'adhésion), J2, J4 et J7 pour observer la réponse cellulaire (morphologie, adhésion et prolifération) par MEB et test de Mosmann.

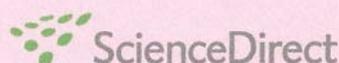
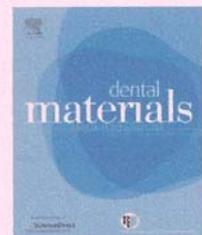
Les résultats ont montré qu'une modification de surface par dépôts de polyélectrolytes pouvait se réaliser sur un matériau métallique comme le Ti. Le choix d'une rugosité de surface ($R_a=0,3 \mu\text{m}$) n'a pas permis une bonne pénétration des polyélectrolytes. Cette rugosité initiale, bien que très faible, a sans doute été à l'origine de la mauvaise organisation des couches polyanioniques et polycationiques mais également de la réticulation insatisfaisante des films à base HA/PLL. La nature intrinsèque et propre au Ti pourrait avoir aussi une explication à la réticulation chimique qui n'a pas eu l'efficacité escomptée.

Les films à base de PSS/PAH ont engendré une meilleure réponse cellulaire fibroblastique que les films à base de HA/PLL réticulés. Tous les films ont permis une adhésion cellulaire dans les premières heures de culture mais en terme de prolifération, les films à base de PSS/PAH sont restés plus favorables pour les fibroblastes que les films à base de HA/PLL réticulés. L'adhésion cellulaire ne serait pas seulement liée à l'hydrophilie de surface mais conjointement à la composition chimique au sein même du biomatériau et à l'énergie de surface. Nos travaux ont confirmé qu'une énergie de surface supérieure à 50 mJ/m^2 favorisait l'adhésion cellulaire. La nature du film est un élément important pour la prolifération mais un élément moins important pour l'adhésion cellulaire. L'adhésion et la prolifération sont ainsi indépendantes l'une de l'autre, la prolifération dépendant de la nature intrinsèque du substrat, de la composition chimique et de la topographie du film. La prolifération est quant à elle modulée par l'hydrophilie de surface : les fibroblastes ont mieux proliféré sur des surfaces moyennement hydrophiles.

La perspective d'une éventuelle application clinique en implantologie avec ces biomatériaux recouverts de FMP à base de PSS/PAH serait une nouvelle approche de l'ostéo-intégration, notamment en introduisant entre les couches des molécules biologiques favorisant ce phénomène. Ce traitement chimique de surface est intéressante en terme d'ingénierie tissulaire avec un enjeu majeur quant aux vastes perspectives d'applications cliniques, notamment en élargissant la recherche sur les alliages NiTi ou $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$.

4.1.3. Article scientifique publié : Dent Mater 2008,24(8):1025-35.

- Impact Factor en 2008 : 2,99.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema

Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium

C. Brunot^{a,b,*}, B. Grosogeat^{a,b}, C. Picart^c, C. Lagneau^a,
N. Jaffrezic-Renault^d, L. Ponsonnet^e

^a Laboratoire des Multimatériaux et des Interfaces, UMR CNRS 5615, Université de Lyon, Université Lyon 1, Faculté d'Odontologie, Rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon Cedex 08, France

^b Hospices Civils de Lyon, Service de Consultations et de Traitements Dentaires, place Depéret, F-69365 Lyon Cedex 07, France

^c Laboratoire de Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires, CNRS UMR 5235, Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 05, France

^d Laboratoire des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5180, Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

^e Laboratoire Polymères Biopolymères Membranes, CNRS UMR 6522, Université de Rouen, Bd Maurice de Broglie, F-76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2006

Received in revised form 7 June 2007

Accepted 21 November 2007

Keywords:

Titanium

Polyelectrolyte multilayer films

Surface roughness

Dynamic contact angle (DCA)

Wettability

Hysteresis (H)

Atomic force microscopy (AFM)

Human fibroblasts

Cell response

ABSTRACT

Objectives. The study of surface properties is a recent and crucial issue in the biomaterial fields applied to Odontology. The reference biomaterial in dental implantology is titanium. The principal objective is a perfect bio-integration in the oral ecosystem, both in terms of mucosal and bone tissues. The aim of this work was to optimize the tissue–titanium interface by applying polyelectrolyte multilayer films on the surface of titanium.

Methods. The experimental study was undertaken on pure titanium samples. Two types of film ending with polycations or polyanions were selected. Both film types were built with a first poly(ethyleneimine) (PEI) base layer and composed either of poly(styrene sulfonate) (PSS) and poly(allylamine hydrochloride) (PAH) or of hyaluronic acid (HA) and poly(L-lysine) (PLL) layers. Final architectures were as follows: PEI-(PSS/PAH)₁₀, or PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS, or chemically cross-linked PEI-(HA/PLL)₁₀ or PEI-(HA/PLL)₁₀-HA. An analysis of the physicochemical characteristics of the surfaces was carried out by tensiometry measurements (dynamic contact angle, wettability, contact angle hysteresis) and atomic force microscopy. A biological study with human fibroblasts was followed over a 7-day culture period at days 0, 2, 4 and 7 to observe the cellular response in terms of morphology (scanning electron microscopy) and viability (Mosmann's test).

Results. The results showed that polyelectrolyte multilayer films could be successfully deposited onto titanium as previously described for glass or composite. Fibroblast adhesion and proliferation was strongly dependent on film type. SEM observations of cells on the different films agreed with the viability cell test. Furthermore, films containing PSS/PAH generated a better cellular response than films containing cross-linked HA/PLL.

* Corresponding author at: Faculté d'Odontologie, Université de Lyon, Université Lyon 1, Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08 France. Tel.: +33 478778689; fax: +33 478778696.

E-mail addresses: cbrunot.gohin@orange.fr (C. Brunot), grosogeat@sante.univ-lyon1.fr (B. Grosogeat).
0109-5641/\$ – see front matter © 2007 Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.dental.2007.11.022

Conclusion. PSS/PAH polyelectrolyte films coating titanium could represent a new approach for oral bio-integration with great potential for clinical application in the fields of dental implantology. More particularly, the specific biofunctionalization of PSS/PAH films coating titanium could be envisioned by introducing layers of molecules that encourage the bio-integration process between the films.

© 2007 Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The build-up of polyelectrolyte multilayer films (PEM) is now widely used for the modification of biomaterial surfaces in order to render them bioactive [1,2], adhesive or non-adhesive for various cell types [3–5]. It is a well-established concept which allows surface modification for the coating of biomaterials in clinical applications as implant materials, prosthesis, and artificial organs [3,6–10]. The principle is based on a layer-by-layer method (LBL) and the assembly of polyanion/polycation constituting a layer pair [11]. This technique is of particular interest in dental and orthopedic implantology for tissue engineering and surface functionalization [10,12]. Biological properties [13,14] and physico-chemical characteristics [15–17] of PEM-coated device surfaces have been investigated to improve the tissue-implant interface [18–20]. Last decades, the field of dental implantology knew an important evolution in clinical applications. Titanium is today the reference for dental implants thanks to its physical, chemical, and mechanical properties [21]. The principal objective is a good bio-integration of dental implants in the oral ecosystem, both in terms of mucosal and bone tissues. Ideally, bioactive molecules could also be incorporated in LBL films at the implant surface to increase bio-integration in terms of quality and time. However, these new biocompatible coatings for dental or orthopedic implants requires the control of several physico-chemical parameters such as layer assembly sequence [22–24], thickness [25,26], surface charge [22,27], pH changes [28–30], salt concentration of polymer [31], roughness [26,32], biodegradability [33–35], biomechanical properties [10], and more importantly biocompatibility [36–39].

In the present study, we wanted to examine the possibility of using titanium as a biomaterial surface for depositing polyelectrolyte multilayer films and for investigating human fibroblast cell response. We focused our attention on two different types of films: a thin dense film made of poly(styrene sulfonate) (PSS)/poly(allylamine hydrochloride) (PAH), which is already known to be favorable to the adhesion of different cells [5,38,40], and a soft hydrated thick film of hyaluronan (HA)/poly(L-lysine) (PLL), which was recently found to be cell resistant to chondrosarcoma and fibroblast cells [5,37]. The physico-chemical characteristics of the titanium-coated surfaces have been investigated in terms of wettability, surface energy, and surface topology. In a second step, we studied human fibroblasts adhesion onto these films coated titanium surfaces. A viability test and observations of cellular morphologies have been performed.

2. Materials and methods

2.1. Titanium samples, polyelectrolytes and multilayer films preparation

2.1.1. Titanium samples preparation

Pure titanium (cp-Ti) samples, provided by Timet[®]Savoie Company (Titanium Metal Corporation), were used. All samples had a squared form with a side of 11 mm and a thickness of 1 mm. Before use, surface polishing was carried out manually with P600 abrasive discs (Buehler[®] SiC Grinding Paper) on one face/surface of each sample to obtain a surface roughness of $R_a=0.3\ \mu\text{m}$. Surface roughness was measured using a Perthometer C5D (Perthen) apparatus. Both faces of the samples were polished (grooves being parallel) for tensiometry analysis. A cleaning/degreasing treatment was carried out by a succession of different ultrasonic baths to eliminate all residual surface impurities: 10 min with acetone then rinsing in ultrapure water filtered with a MilliQ-plus system (Millipore 18.2 M Ω), followed by 10 min with absolute ethanol and rinsing with ultrapure water, and finally completed by 10 min with ultrapure water and then dried with nitrogen gas. To confirm the results, samples were recycled, polished again according to the preset protocol on the same face/surface (mechanical cleaning) and cleaned again according to the above method (chemical cleaning).

2.1.2. Polyelectrolyte solutions and multilayer films preparation

Poly(sodium-4-styrene sulfonate) (PSS, MW = 70 kDa), Poly(allylamine hydrochloride) (PAH, MW = 70 kDa), Poly(ethyleneimine) (PEI, MW = 70 kDa, 50 wt% solution in water), Poly(L-lysine) (PLL, MW = 32 kDa) and sodium chloride (NaCl, purity ~99%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hyaluronan acid (HA, MW = 400 kDa) was obtained from Bioiberica (Barcelona, Spain). The polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of the polyelectrolyte powder in 0.15 M NaCl at pH 6.5 (using ultrapure filtered water, MilliQ-plus system). The final concentrations of polyelectrolyte solutions were 5 mg/ml for PEI, PSS and PAH, and 1 mg/ml for PLL and HA.

Two types of PEM films were built, both with a PEI precursor base layer. Then, they were composed either of PSS and PAH layers, or of HA and PLL layers. PEM films were assembled on the above substrate as previously described [11]. Each polyelectrolyte was adsorbed for 10 min followed by two rinsing in the 0.15 M NaCl solution (3 min each one). HA/PLL films were chemically cross-linked after their buildup

with a mixture of *N*-dimethylaminopropyl-ethylcarbodiimide (EDC) (Sigma–Aldrich) (final concentration at 35 mg/ml in NaCl at 0.15 M) and *N*-hydroxy-sulfosuccinimide (NHS) (Fluka) (final concentration at 5.5 mg/ml in NaCl at 0.15 M) [37,41–43]. The cross-linking is based on the reaction of activated carboxylic sites with primary amine groups [44] in the presence of EDC/NHS. Briefly, the fresh mixture was prepared at pH 5. HA/PLL films-coated samples were introduced in 24-well culture plates and put in contact with 0.5 ml of the cross-linker EDC/NHS for 12 h at 21 °C. Then, two successive rinsings were carried out with NaCl solution at pH 6.5 for 30 min each. Final architectures were as follows: PEI-(PSS/PAH)₁₀ and PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS, cross-linked PEI-(HA/PLL)₁₀ and cross-linked PEI-(HA/PLL)₁₀-HA. The films were all prepared at the same pH 6.5. Two methods were used to build PEM films: a robotized method (Dipping robot DR3 Kirstein GmbH, Germany) [37,41,42] for surface characterizations, and a manual method for cell culture. A cleaning was performed in ultrapure water before surface characterizations and cell culture.

2.2. Surface characterizations

2.2.1. Dynamic contact angle (DCA) and hysteresis (H) measurements

The advantage of tensiometry, which is a dynamic technique, is that the contact angles (advancing and receding contact angles) are quickly and accurately obtained compared to other methods such as the sessile drop method or the captive bubble method [45]. The theoretical background of the Wilhelmy experiment and the contact angle calculations are described in detail elsewhere [46]. The DCA measurements were performed with a Wilhelmy balance using the 3S Tensiometer Balances and its corresponding software (GBX Instruments, France). The titanium samples were coated with polyelectrolyte multilayer films on both sides. Before measurements, samples were rinsed in 18.2 MΩ Millipore water for 30 min in order to eliminate NaCl traces which could modify results. Samples were then dried at 30–35 °C for 2 h. The DCA was determined at 21 °C and five cycles by types of PEM films were measured at a 50 μm/s speed in ultrapure water (five samples for each type of films). This very low speed was chosen in order to measure a contact angle in quasi-static conditions [47].

The water hysteresis angle (*H*) is the difference between the water advancing angle (θ_A) and the water receding angle (θ_R) in pure water. This parameter characterizes the physico-chemical surface properties of a substrate, such as roughness, chemical composition, heterogeneities, mobility of macromolecules, and swelling.

2.2.2. Surface free energy (SFE) and dispersive components calculations

As opposed to the DCA measurements, the SFE and dispersive components were calculated with the software Windrop (GBX, France). Both calculations were determined using the Van Oss (VO) approach by DCA measurements [48]. Three liquids were used as a probe for SFE calculations: diiodomethane, formamide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and

ultrapure water. The contact angle used for this calculation was the average of the first cycle advancing contact angle (θ_A) and the SFE of the different films were calculated using the VO approach, as usual with sessile drop method contact angles [15,16,47,49].

2.2.3. Analysis of polyelectrolyte film morphology and roughness by atomic force microscopy (AFM)

The interest of AFM is to obtain three-dimensional (3D) topographic images at the nanometer scale. The AFM allows one to observe structures in a physiological environment whereas the scanning electron microscopy needs dehydration and metallization of the samples [50].

AFM images were obtained in area contact mode with the Nanoscope IV from Digital Instruments (Santa Barbara, CA) [26]. Deflection and height mode images were scanned simultaneously at a fixed scan rate (2 Hz) with a resolution of 512 pixels × 512 pixels. The mean roughness of the films was calculated according to

$$R = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{i=1}^{N_x} \sum_{j=1}^{N_y} |z_{ij} - z_{\text{mean}}|$$

where z_{ij} is the height of a given pixel, z_{mean} is the average height of the pixels, and N_x and N_y are the number of pixels in the *x* and *y* directions. The 50 μm × 50 μm images were used for the roughness calculation.

2.2.4. Analysis of polyelectrolyte films by confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Fluorescein labeled poly(L-lysine) (PLL^{FITC}, MW = 30 kDa from Sigma, France) was used as fluorescent polyelectrolyte to visualize the cross-linked HA/PLL films as previously described [51]. The CLSM images were acquired with the Zeiss LSM510 confocal microscope using a 40× objective.

2.3. Cell study

Fibroblast cells were used to evaluate the biological response onto film-coated titanium surfaces. Biocompatibility parameters included cell morphology as studied by scanning electron microscopy (SEM) and cell viability as measured by Mosmann's colorimetric test [52]. Cell cultures were maintained for 7 days and studied at 2 h of adhesion at day 0 (D0), day 2 (D2), day 4 (D4), and day 7 (D7). Before the cell study, samples were rinsed in ultrapure water for 1 h to eliminate the NaCl traces and dried with nitrogen gas. Finally, samples were placed in 24-well tissue culture plates (Nunc) and UV sterilized (UVA 100–200 HPV, Honle UV technology, 1000 W) for 10 min and stored at room temperature until they were used.

2.3.1. Fibroblast cells

Human fibroblasts were obtained by the explant technique [53] in the course of an oral surgery after the consent of an informed patient. Explant cultures were obtained from the coronary bag of a wisdom tooth and the biopsy showed no inflammation signs. Immediately following removal, the biopsy was stored in a Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Eurobio, Les Ulis, France) containing 10% fetal

bovine serum (FBS) (AbCys, Paris, France) supplemented with 100 U/ml penicillin (P) and 50 μ g/ml streptomycin (S) (Boehringer Mannheim, Ottweiler, Germany), and 250 μ g/ml fungizone (F) (Gibco, Paisley, UK), then cut into small fragments of 2 mm³, placed on plastic culture plates, maintained in a DMEM+10% FBS+P/S mixture+F, and finally at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The culture medium was changed every 2 days. When primary cultures were confluent, secondary cultures were generated. A rinsing of primary cultures was carried out with a phosphate-buffered saline (PBS) and P/S mixture, the cells were then subdivided by trypsin using trypsin-EDTA solution (trypsin 0.05% and ethylene-diaminetetraacetic acid 0.02%, Eurobio). The cellular seeding was started from these secondary cultures. For each handling, the number of cells was determined with an electronic cell counter (Beckman Coulter Z1, Fullerton, England) and concentration was adjusted at about $(10\text{--}15) \times 10^3$ cells/cm² onto substrates placed in standard 24-well tissue culture plates (100 μ l cellular suspension for each samples).

2.3.2. Cell morphology (SEM)

Cellular morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM) at each point-time of the culture. The samples were routinely prepared according to the following method. Briefly, a fast rinsing was carried out with a PBS solution (pH 7.2) and samples were fixed 30 min at 4 °C with a glutaraldehyde buffer (2%) (Sigma-Aldrich) mixed 1/1 with a sodium cacodylate buffer (CaCo 0.1 M) (Sigma-Aldrich). Samples were rinsed for 30 min in a CaCo buffer (0.2 M) and post-fixed 30 min at 4 °C with an osmium tetroxide solution (OsO₄, 1%) added with a CaCo buffer (0.2 M). The final rinsing was carried out with distilled water at room temperature. Samples were subsequently rinsed in PBS and dehydrated in sequential-graded concentrations of ethanol-acetone solutions (Carlo Erba, France) (30/70, 50/50, 70/30) for 5 min each and immersed for 5 min in pure acetone. Following evaporation of acetone, the samples were then mounted on copper stubs with silver paint. A gold-palladium cathode sputtering (0.1 mbar) (Balzers) was made under a constant current of 25 mA for 2 min 30 s. Finally, samples were examined under a Hitachi S800 scanning electron microscope (Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 5 kV (Technological Microstructures Center, University of Lyon, France).

2.3.3. Cell viability (Mosmann's test)

A quantitative colorimetric test (methylthiazol tetrazolium (MTT) test) was performed after each day of culture to characterize cellular metabolism and cell viability [52]. The viable cells have a mitochondrial enzymatic activity that transforms the MTT into insoluble formazan precipitates. The MTT filtered solution (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) was added to the cell cultures at the following standpoints after seeding: 2 h (D0), 2nd day (D2), 4th day (D4) and 7th day (D7). Each day, wells were incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The medium was then drawn out and the dark-blue crystals left in the wells were dissolved in a 500 μ l of ethanol-dimethylsulfoxide solution (v/v) (DMSO) (Amresco,

Solon, OH, USA). The optical density (OD) was measured at 570 nm using a 96-well micro plate reader (Becton Dickinson, Lincoln Park, USA) in a spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). The blank reference was taken from an ethanol-DMSO solution alone. The value of the optical density was proportional to the cellular activity and thus reflects a measure of the cell viability. In addition, the absorbance of the dye varied linearly with the number of viable cells per well.

2.4. Statistical analysis

The collected data of tensiometry and Mosmann's test were treated with an Excel software version Microsoft 2000. For each handling, all graphs showed the measured values and their standard deviations. The basic statistics were calculated using a Stat-View software (version 5.0) (Hopper Institute Inc., Cary, NC, USA). A Student's statistical test was used with non-paired series (unpaired T-test) for comparisons of the different surfaces versus bare titanium samples. Probabilities of correlation using the Pearson's coefficient (*p*) considered correct *p*-value below 0.05 as a statistically significant.

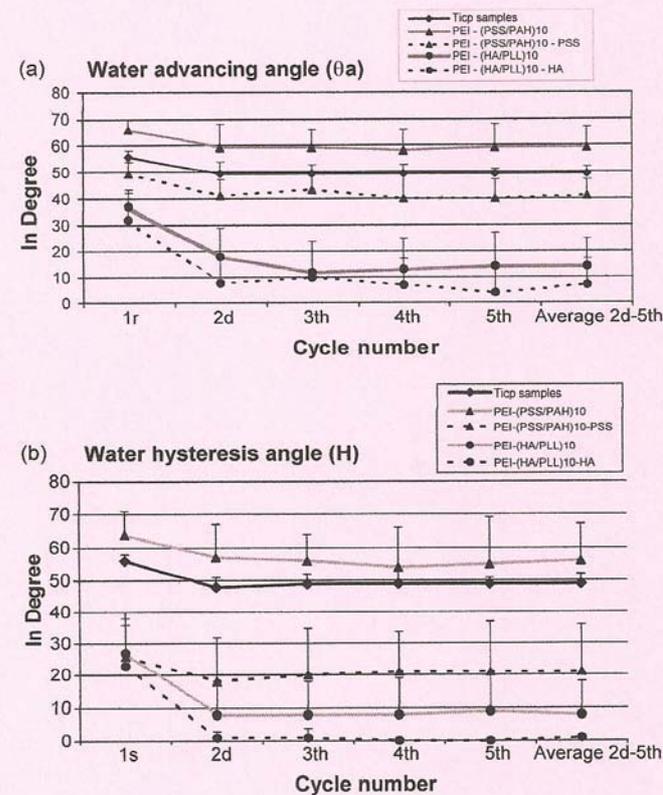


Fig. 1 – Water advancing angle (θ_A) (a) and water hysteresis angle (H) (b) of bare titanium samples, Ti + PEI-(PSS/PAH)₁₀, Ti + PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS, Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀ cross-linked and Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀-HA cross-linked samples. Five samples for each type of polyelectrolyte films were analyzed (five cycles by sample). Experiments were performed at 21 °C at a speed of 50 μ m/s. θ_A and H were measured in degree ($H = \theta_A - \theta_R$, θ_R receding angle in degree).

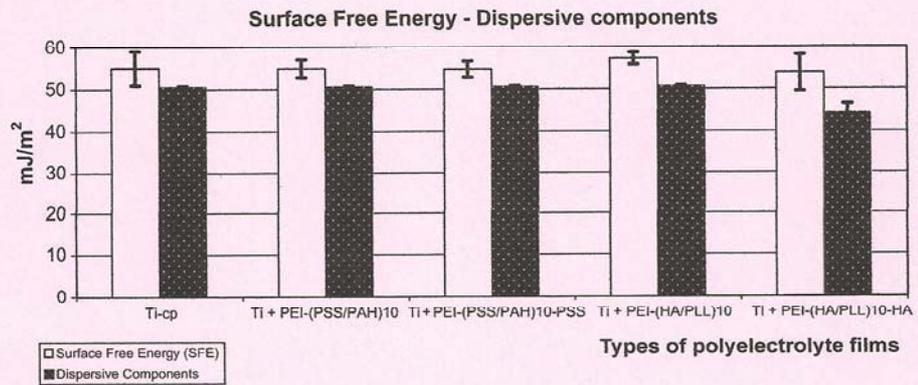


Fig. 2 – Surface free energy (SFE) and dispersive components of bare titanium samples, Ti + PEI-(PSS/PAH)₁₀, Ti + PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS, Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀ cross-linked and Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀-HA cross-linked samples. No significant differences for all types of PEM films.

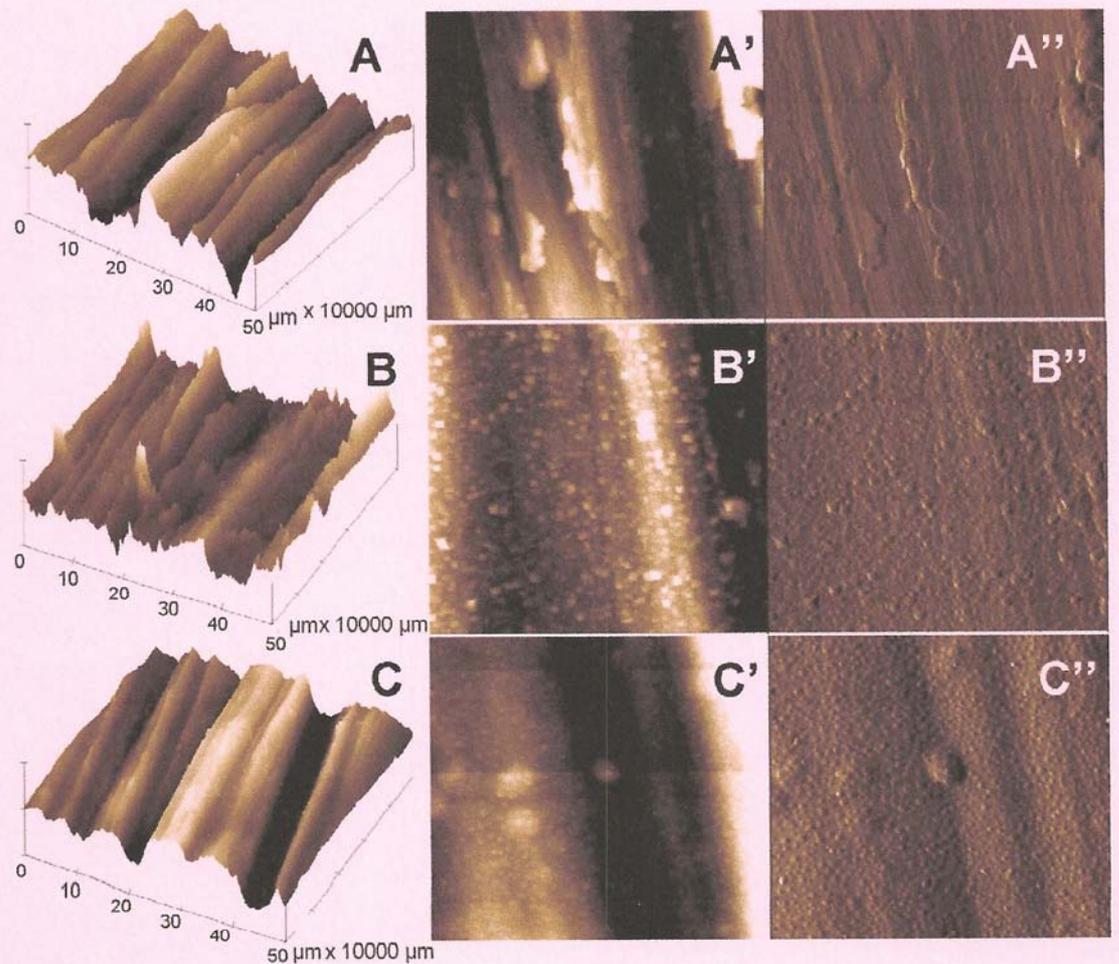


Fig. 3 – AFM images of bare titanium samples (A, A', A''), Ti + PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS samples (B, B', B'') and of Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀-HA cross-linked samples (C, C', C''). (A–C) are 3D views of AFM height mode images (image dimensions are 50 μm x 50 μm) and the maximum Z-range are respectively 1000 nm, 900 nm and 1200 nm. At higher magnification, height mode images and deflection images are shown (image dimensions 7.5 μm x 7.5 μm). The maximum Z-range for the height mode images are 300 nm (A', A'' and C', C'') and 400 nm (B', B'').

3. Results

3.1. Surface characterizations of PEM films

3.1.1. Dynamic contact angle (DCA) and hysteresis (H) measurements

The results of wettability measurements are shown in Fig. 1. Water advancing angle (θ_A) are summarized in Fig. 1a for each PEM films ending with the corresponding polycation or polyanion. At the first cycle, θ_A are $56 \pm 2^\circ$ for Ti samples, $66 \pm 4^\circ$ for (PSS/PAH)₁₀ films and $49 \pm 5^\circ$ for (PSS/PAH)₁₀-PSS films. These films are considered to be moderately hydrophilic films. At the other cycles, θ_A are lower but stay constant (respectively, $49 \pm 3^\circ$, $59 \pm 8^\circ$, $41 \pm 6^\circ$). At the first cycle, θ_A are $37 \pm 6^\circ$ for cross-linked (HA/PLL)₁₀ films and $32 \pm 1^\circ$ for cross-linked (HA/PLL)₁₀-HA films. Cross-linked HA/PLL films are even more hydrophilic than PSS/PAH ones. At the other cycles, θ_A are lower but stay constant (respectively, $14 \pm 11^\circ$ and $7 \pm 10^\circ$).

The results of hysteresis (H) are given for the different films in Fig. 1b. The results of H for control samples ($56 \pm 2^\circ$) and (PSS/PAH)₁₀ films ($64 \pm 7^\circ$) show at the first cycle a high H which remains constant during the following cycles. Therefore, although the PAH and PSS ending films have similar advancing angles, H is lower for the PSS ending films ($26 \pm 14^\circ$) which remains constant for following cycles. Cross-linked (HA/PLL)₁₀ films ($27 \pm 11^\circ$) and cross-linked (HA/PLL)₁₀-HA films ($23 \pm 13^\circ$) have respectively a weak H falling with the second cycle towards $8 \pm 10^\circ$ and $1 \pm 2^\circ$ for the following cycles.

3.1.2. SFE and dispersive components calculations

Values of SFE and dispersive components are presented in Fig. 2. Controls and all films have the same SFE value (55 mJ/m^2). Regarding the dispersive component, it is so

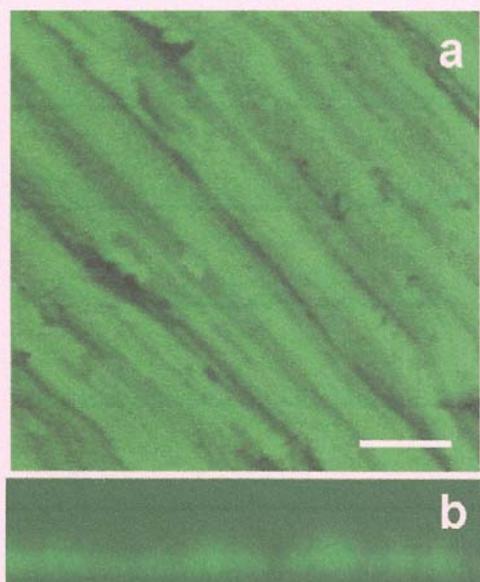


Fig. 4 – CLSM observations of a cross-linked PEI-(HA/PLL)₉-HA-PLL^{FTIC} deposited onto titanium. Top view of the film (image size $46.1 \mu\text{m} \times 46.1 \mu\text{m}$, scale bar $10 \mu\text{m}$) (a) and cross-section of the film (b).

approximately equal (50.8 mJ/m^2) but slightly lower for cross-linked PEI-(HA/PLL)₁₀-HA ($44.4 \pm 2 \text{ mJ/m}^2$). The outermost layer of film has not a great influence.

3.1.3. AFM images

The topography of the films was observed using AFM (Fig. 3). As a single polyelectrolyte layer does not allow to see significant differences on the AFM images, only (PSS/PAH)₁₀-PSS and cross-linked (HA/PLL)₁₀ films are shown. Images are represented in 3D (Fig. 3A–C) and 2D (Fig. 3A'–C' and Fig. 3A''–C'').

The titanium control surface is shown in Fig. 3A, A', A''. The parallel grooves are clearly visible and roughness is 213 nm. When titanium was covered by the PSS/PAH films, the small scale roughness has decreased and small nodules are visible, that look similar to those observed for PSS/PAH films deposited on bare glass [26]. The mean roughness is 142 nm for these PSS/PAH films coated Ti surfaces. Cross-linked HA/PLL films have an even larger effect on the large-scale roughness and tend to smooth the surface (Fig. 3C). However, a nodular aspect is also observed at the micrometer length scale (Fig. 3C', C''). Surface roughness of the HA/PLL films-coated Ti is also 170 nm.

3.1.4. CLSM observations

Cross-linked PEI-(HA/PLL)₉-HA-PLL^{FTIC} films, which are about $1 \mu\text{m}$ in thickness [23] were observed by CLSM (Fig. 4). As PEI-(PSS/PAH)₁₀ films are only about 50 nm in thickness [54], they could not be visualized by this type of microscopy. The PEM film is visualized by the green fluorescence. It entirely covers the titanium sample but some deep grooves are still visible.

3.2. Cell study

3.2.1. Cell morphology (SEM)

The SEM fibroblast results are shown in Figs. 5 and 6 at each point-time of cell cultures. At the surface of Ti control samples (Fig. 5A–D), many fibroblasts adhered as soon as 2 h after seeding and displayed a spindle-shaped or elongated morphology. Cells were numerous and had a normal fusiform aspect with many characteristic dendritic digitations (Fig. 5A). At D2 (Fig. 5B), the fine and long filopodia formed a cellular group along the same direction of the polished grooves. At D4 (Fig. 5C), fibroblastic cells extended preferentially along the same direction of the polished grooves and were largely confluent, intimately intermingled. At D7, they tangled up to the surface (Fig. 5D). Many cells formed a cellular unity which exhibited a flat morphology. Cellular growth was important and the cell coverage was dense for control samples. Similar results were noted for (PSS/PAH)₁₀ films and for (PSS/PAH)₁₀-PSS films at the same point-time of the 7-day cell culture period (Fig. 5A' and A'', B' and B'', C' and C'', D' and D'').

On Ti surfaces coated by cross-linked HA/PLL films (Fig. 6A, A'), cells demonstrated a characteristic fibroblastic cellular form at D0 similar to control samples and PSS/PAH films. At D2 (Fig. 6B, B'), fibroblasts were less numerous although most of them exhibited some dendritic digitations. At D4 (Fig. 6C, C'), fibroblasts showed the first signs of a decreased cellular attachment with the substrates. Although some cellular clusters are still attached to the surfaces, they appear to unhook and leave the substrate surfaces (Fig. 6D, D'). This appears for

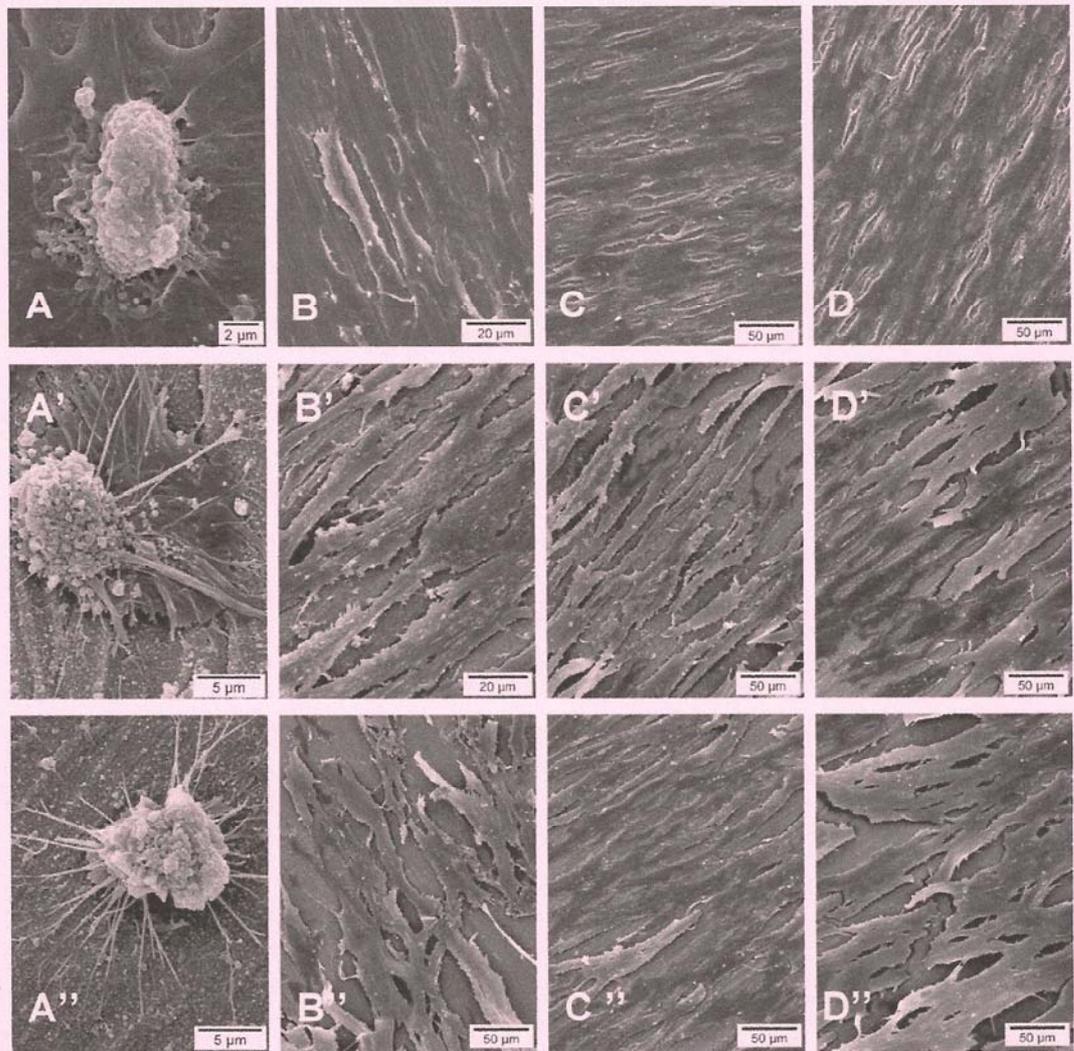


Fig. 5 – Scanning electron micrographs of the bare titanium samples (A–D) at D0 (panel A, 7000×), D2 (panel B, 1100×), D4 (panel C, 400×) and D7 (panel D, 400×). Scanning electron micrographs of the Ti+PEI-(PSS/PAH)₁₀ (A'–D') and Ti+PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS samples (A''–D'') at D0 (panel A', A'', 5000×), D2 (panel B', 1100×; panel B'', 400×), D4 (panel C', C'', 400×) and D7 (panel D', D'', 400×).

both (HA/PLL)₁₀ and (HA/PLL)₁₀-HA cross-linked films. After a 7-day culture period, the morphology of cells was even more striking. Cells in contact with cross-linked HA/PLL films were round and exhibited necroses as opposed to elongated and spread morphologies on the highly proliferative PSS/PAH films at D7 (Fig. 6D, D'). SEM micrographs of cross-linked HA/PLL films coating Ti clearly demonstrated signs of a decreased attachment and many cellular clusters were no longer adherent to the surfaces. Surface grooves were visible as opposed to control samples and PSS/PAH films where a thick cellular group was present (Fig. 5D, D' and D'').

3.2.2. Cell viability (Mosmann's test)

The fibroblastic viability on the different types of surfaces is shown in Fig. 7. At D0, OD was similar for the bare surfaces and for all types of films coating surfaces. At D2 and D4, similar results of an increased OD were noted for controls and PSS/PAH coating samples. At D2, OD of cross-linked

HA/PLL films is lower than the other surfaces. At D4, the high values of OD for bare surfaces and Ti coating PSS/PAH films were opposed to the low value for surfaces coated by cross-linked HA/PLL films. OD continuously increased for the Ti and PSS/PAH-coated samples until day 7 whereas it increased until D4 for the cross-linked HA/PLL films and subsequently decreased at D7. Fibroblast cells exhibited higher proliferation rate and cell density on Ti control samples (OD=0, 71) and PSS/PAH films (OD=0, 54–0, 56) than cross-linked HA/PLL films (OD=0, 27–0, 29).

4. Discussion

In this study, we investigated the cell adhesion and viability of fibroblasts on top of different PEM films coating titanium and measured the corresponding wettability of these films. The cell study was undertaken using human fibroblasts *in situ* in order to simulate the trans-mucosal part of the dental

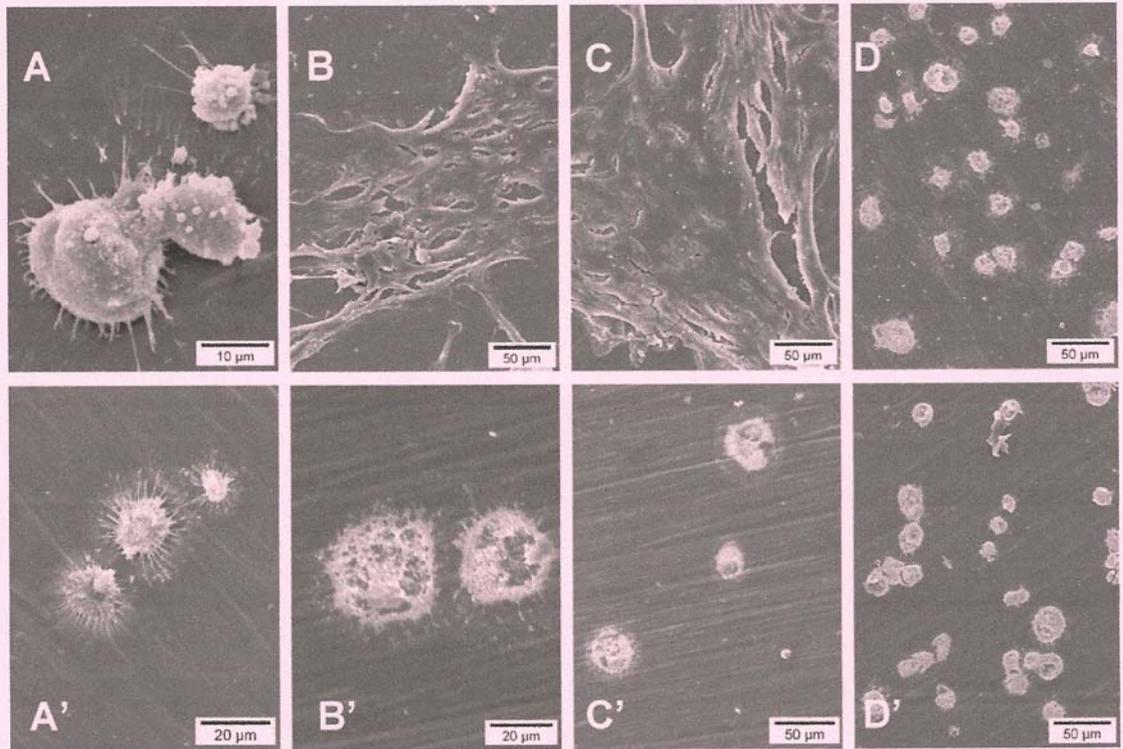


Fig. 6 – Scanning electron micrographs of the Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀ (A–D) cross-linked and Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀-HA cross-linked samples (A'–D') at D0 (panel A, 2500x; A', 1100x), D2 (panel B, 400x; B', 1100x), D4 (panel C, C', 400x) and D7 (panel D, D', 400x).

implant which carries the conjunctivo-epithelial attachment [55]. SEM analysis and MTT results were in accordance with previous results found on the biocompatibility and biofunctionality of Ti using fibroblast cell cultures [17,49,56–59]. As opposed to bare surfaces and PSS/PAH films, cross-linked HA/PLL films clearly resulted in modified cellular morphologies. As a consequence, fibroblast cell proliferation exhibited

great differences depending on the type and the nature of PEM films.

For PSS/PAH films, the PSS or PAH-ending films gave the same proliferation. This was in agreement with previous findings showing that fibroblast [5], endothelial [40] and osteoblast [38] cells adhere and proliferate well such films. We also investigated cross-linked HA/PLL films as these films were

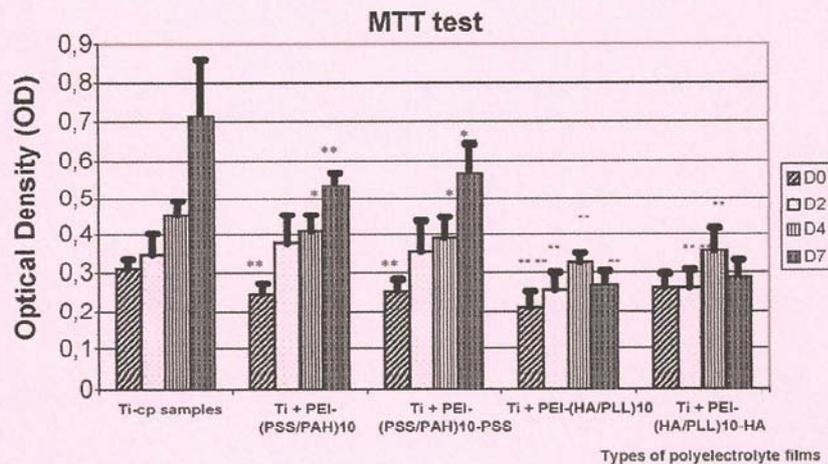


Fig. 7 – Fibroblast viability on bare titanium samples, Ti + PEI-(PSS/PAH)₁₀, Ti + PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS, Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀ cross-linked and Ti + PEI-(HA/PLL)₁₀-HA cross-linked samples. The results are the average of three independent experiments. Cellular mitochondrial activity was measured at D0, D2, D4 and D7 and the values are the average of 10 samples per day. The optical density (OD) was measured at 570 nm. Student's t-test: **p* < 0.05 and ***p* < 0.001 vs. Ti. The error bars represent the standard deviations for each point-time of culture.

recently found to be much more favorable than native HA/PLL films for chondrosarcoma cells [37,42], primary chondrocytes [41], and osteoblasts [43]. However, in this study we did not observe a positive influence. It is possible that this bad result provided that the cross-linking protocol was performed at a higher temperature (21 °C) and with a lower NHS concentration (5.5 mg/ml). This may result in a low cross-linked film. In the case of films cross-linked at low density, we observed an intermediate state with some cells adhering and proliferating [42].

Some studies [60–62] have also focused on the contact angle measurement of different films and shown that the outermost layer of the film has an influence [5]. In the same way, Chen et al. [16] studied different types of film by the DCA method and correlated it as a function of the number of layer pairs and the outermost layer. They attributed these changes to the reorganization of the film components and to the adjacent layer inter-penetration. PEM films also allow the wetting behavior of a surface to be changed. For instance, coating a silicone rubber substrate with PSS/poly(ethyleneimine) and laminine/poly(D-lysine) film renders the surface more hydrophilic than the bare substrate [36]. These results showed that the θ_A and H values depend more on the type of PEM film and the substrate than on the outermost layer nature of the film. Kolasinska and Warszynski [62] reported also that the effect of support material modified the wettability of PEM films, and particularly on titanium coated by PSS/PAH films. For polymers, H is often due to heterogeneities in surface composition and to surface roughness, but the motility of polar side groups on the polymer molecules near the liquid–solid interface can also contribute. As it was demonstrated by Kolasinska and Warszynski [62], each result is specific to a particular polyelectrolyte and cannot be deduced from any other one. A θ_A lower than 60° corresponds to a hydrophilic substrate and higher than 60° to a hydrophobic substrate [15,45,48]. All films and bare surfaces are hydrophilic in our work. A difference between θ_A and θ_R indicates imperfect surface properties (roughness, chemical heterogeneity, molecular mobility) or a capacity for the surface to be reoriented and/or to inflate in contact with the liquid. A roughness higher than 100 nm can also be responsible for hysteresis [45]. θ_R approaching 0° is generally due to a water film [63] as it was the case for controls and (PSS/PAH)₁₀-PAH films. In pure water, H of 0° means that the surface treatment is controlled, chemically homogeneous, and very wetted, as was found for cross-linked HA/PLL films. It indicates that the substrate is not very rough, absorbent, chemically heterogeneous, and/or very mobile. An H highly different from 0° indicates the reverse, as for PSS/PAH films. Numerous parameters such as roughness and chemical composition [49], zeta potential and film hydration are important in cell response to a biomaterial [45]. Thus the wettability parameters for PEM films can be correlated to cell response, such as cell adhesion and cell proliferation [5]. In this study, it was demonstrated that the optimum-advancing angle is about 60° for cell adhesion and receding angle lower than 30°. Similar relationships between cell attachment and contact angles values can be found in literature as well as with different cell types [48]. Spreading and growth indices obtained for various polymer surfaces and the related cell–polymer interactions with SFE also correlate with contact angles in a similar way as Vogler

relationships [48]. Thus, apparently, substratum wettability affects the latter stages of cell adhesion in a manner similar to attachment. Both PSS/PAH and cross-linked HA/PLL films allow the fibroblast adhesion as control samples. The cell adhesion is satisfactory for hydrophilic films as PSS/PAH films as for more hydrophilic HA/PLL films. Adhesion depends, also strongly, on the SFE. It had been shown that a SFE higher than 50 mJ/m² presented a better cell adhesion [56,59]. All studied films have an SFE at about 55 mJ/m², they allow a fibroblast adhesion at D0. These results confirm that cell adhesion is correlated with the wettability and the SFE of biomaterial.

Furthermore, cell proliferation is modulated by the nature and the hydrophobic character of the films and not to the SFE. PSS/PAH films allow a very good cell proliferation as opposed to cross-linked HA/PLL films, as confirmed by SEM images (Figs. 5 and 6) and MTT tests (Fig. 7). Hydrophilic PSS/PAH films allow a good cell proliferation after a 7-day culture period whereas the too much hydrophilic HA/PLL films do not allow a good proliferation. The results are in accordance with those of Vogler [48], who described a good cell proliferation on surfaces with a θ_A between 50° and 60°. The proliferation, for the same SFE, is different for PSS/PAH and cross-linked HA/PLL films. The nature of the cell line, the type of films, and the SFE of the substrate are important parameters for a good cell proliferation. In conclusion, cell adhesion and proliferation are independent, as previously published for other PEM films deposited onto glass and for the same cell type [5], the proliferation depending on the intrinsic nature of the under layer substrate and on the chemical composition of the films.

5. Conclusion

The aim of this work was to optimize tissue–titanium interface by applying polyelectrolyte multilayer films on the surface of titanium. The results confirmed the hypothesis that polyelectrolyte multilayer films can be successfully deposited onto titanium as previously described for glass or composite. The development of PEM films coating titanium must be viewed in light of their biocompatibility and potential clinical applications in the field of implantology. PEM films containing PSS/PAH generate a better cellular response than films containing cross-linked HA/PLL as shown by an increase in both fibroblast cell adhesion and more particularly cell proliferation.

While polyelectrolyte multilayer films are a promising coating in the fields of implantology, titanium biomaterials with PSS/PAH polyelectrolyte films represent a new approach for oral bio-integration with great potential for clinical application. The association of physico-chemical properties of titanium and biological PEM films properties could allow optimizing bio-integration of dental implants. Furthermore, biofunctionalization of these films can be envisioned by introducing bioactive molecules within the film layers such as to foster the bio-integration process. However, further optimization will be needed to adopt this new class of materials, besides biocompatibility, and other parameters should be investigated such as sterilization conditions conformed to the biomedical normalities, degradability in saliva or in fluoridic medium, and

the possible chemical modifications consecutive to temperature changes in the oral cavity.

Acknowledgments

The authors are very thankful to *Timet®* Savoie Company for providing titanium samples.

REFERENCES

- [1] Chluba J, Voegel JC, Decher G, Erbacher P, Schaaf P, Ogier J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* 2001;2(3):800–5.
- [2] Van den Beucken JJ, Walboomers XF, Vos MR, Sommerdijk NA, Nolte RJ, Jansen JA. Cyto- and histocompatibility of multilayered DNA-coatings on titanium. *J Biomed Mater Res A* 2006;77(1):202–11.
- [3] Ai H, Jones SA, Lvov YM. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochem Biophys* 2003;39(1):23–43.
- [4] Richert L, Arntz Y, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. pH dependent growth of poly(L-lysine)/poly(L-glutamic) acid multilayer films and their cell adhesion properties. *Surf Sci* 2004;570(1/2):13–29.
- [5] Mhamdi L, Picart C, Lagneau L, Othmane A, Grogogeat B, Jaffrezic-Renault N, et al. Study of the polyelectrolyte multilayer thin films properties and correlation with the behavior of the human gingival fibroblasts. *Mater Sci Eng* 2006;26:273–81.
- [6] Fussell G, Cooper S. Synthesis and characterization of acrylic terpolymers with RGD peptides for biomedical applications. *Biomaterials* 2004;25(15):2971–8.
- [7] Richert L, Lavalle P, Payan E, Shu XZ, Prestwich GD, Stoltz JF, et al. Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* 2004;20(20/2):448–58.
- [8] Etienne O, Picart C, Taddei C, Keller P, Hubsch E, Schaff P, et al. Polyelectrolyte multilayer film coating and stability at the surfaces of oral prosthesis base polymers: an in vitro and in vivo study. *J Dent Res* 2006;85(1):44–8.
- [9] Schultz P, Vautier D, Richert L, Jessel N, Haikel Y, Schaff P, et al. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials* 2005;26(15):2621–30.
- [10] Pavoor PV, Gearing BP, Muratoglu O, Cohen RE, Bellare A. Wear reduction of orthopaedic bearing surfaces using polyelectrolyte multilayer nanocoatings. *Biomaterials* 2006;27(8):1527–33.
- [11] Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* 1997;277:1232–7.
- [12] Cai KY, Rechtenbach A, Hao JY, Bossert J, Jandt KD. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials* 2005;26(30):5960–71.
- [13] Boulmedais F, Frisch B, Etienne O, Lavalle Ph, Picart C, Ogier J, et al. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* 2004;25(11):2003–11.
- [14] Fu J, Ji J, Yuan W, Shen J. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* 2005;26(33):6684–92.
- [15] Andrade J, Smith LM, Gregonis DE. The contact angle and interface energetics, surface and interfacial aspects of biomedical polymers, 1. New York, London: Plenum Press; 1983. pp. 249–289.
- [16] Chen J, Luo G, Cao W. The study of layer-by-layer ultrathin films by the dynamic contact angle method. *J Colloid Interface Sci* 2001;238:62–9.
- [17] Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblasts. *Biomaterials* 2003;24(25):4663–70.
- [18] Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. I. Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 1998;106:527–51.
- [19] Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. II. Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106:721–64.
- [20] Eisenbarth E, Velten D, Schenk-Meuser K, et al. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomol Eng* 2002;19(2–6):243–9.
- [21] Duran A, Conde A, Coedo AG, et al. Sol-gel coatings for protection and bioactivation of metals used in orthopaedic devices. *J Mater Chem* 2004;14:2282–90.
- [22] Ladam G, Schaad P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 2001;16(3):1249–55.
- [23] Picart C, Lavalle P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, et al. Buildup mechanism for poly-L-lysine/hyaluronan acid films onto a solid surface. *Langmuir* 2001;17(23):7414–24.
- [24] Kim HJ, Lee K, Kumar S, Kim J. Dynamic sequential layer-by-layer deposition method for fast and region-selective multilayer thin film fabrication. *Langmuir* 2005;30(21/18):8532–8.
- [25] Halthur TJ, Elofsson UM. Multilayers of charged polypeptides as studied by in situ ellipsometry and quartz crystal microbalance with dissipation. *Langmuir* 2004;20(5):1739–45.
- [26] Lavalle Ph, Gercely C, Cuisinier FJ, Decher G, Schaaf G, Voegel JC, et al. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: a in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* 2002;35(11):4458–65.
- [27] Antunes FE, Marques EF, Gomes R, Thuresson K, Lindman B, Miguel MG. Network formation of catanionic vesicles and oppositely charged polyelectrolytes: effect of polymer charge density and hydrophobic modification. *Langmuir* 2004;25(20/11):4647–56.
- [28] Yang SY, Rubner MF. Micropatterning of polymer thin films with pH-sensitive and cross-linkable hydrogen-bonded polyelectrolyte multilayers. *J Am Chem Soc* 2002;124:2100–1.
- [29] Gergely C, Bahi S, Szalontai B, Flores H, Schaaf P, Voegel JC, et al. Human serum albumin self-assembly on weak polyelectrolyte multilayer films structurally modified by pH changes. *Langmuir* 2004;22(20/13):5575–82.
- [30] Burke SE, Barrett CJ. pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules* 2003;4(6):1773–83.
- [31] Buron CC, Filiatre C, Membrey F, Peerot H, Foissy A. Mass and charge balance in self-assembled multilayer films on gold: measurements with optical reflectometry and quartz crystal microbalance. *J Colloid Interface Sci* 2006;296(2):409–18.
- [32] Picart C, Ladam G, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, et al. Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: a comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. *J Chem Phys* 2001;115(2):1086–94.

- [33] Sabot A, Krause S. Simultaneous quartz crystal microbalance impedance and electrochemical impedance measurements: investigation into the degradation of thin polymer films. *Anal Chem* 2002;15(74):3304–11.
- [34] Ren K, Wang Y, Ji J, Lin Q, Shen J. Construction and deconstruction of PLL/DNA multilayered films for DNA delivery: effect of ionic strength. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2005;46(2):63–9.
- [35] Garza JM, Jessel N, Ladam G, Dupray V, Muller S, Stoltz JF, et al. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartment films. *Langmuir* 2005;21(26):12372–7.
- [36] Ai H, Meng H, Ichinose I, Jones S, Mills D, Lvov Y, et al. Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *J Neurosci Methods* 2003;128:1–8.
- [37] Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux F, Decher G, et al. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* 2004;5(2):284–94.
- [38] Tryoen-Toth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chluba J, et al. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res* 2002;15(60/4):657–67.
- [39] Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosgeat B. Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 2007;28(4):632–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.026>.
- [40] Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, et al. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* 2003;24(20):3521–30.
- [41] Richert L, Schneider A, Vautier D, Vodouhe C, Jessel N, Payan E, et al. Imaging cell interactions with native and cross-linked polyelectrolyte multilayers. *Cell Biochem Biophys* 2006;44(2):273–86.
- [42] Schneider A, Francius G, Obeid R, Schwinté P, Frisch B, Schaaf P, et al. Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir* 2006;22(3):1193–200.
- [43] Picart C, Elkaim R, Richert L, Audoin F, Da Silva Cardoso M, Schaaf P, et al. Primary osteoblasts adhesion onto RGD functionalized and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. *Adv Funct Mater* 2005;15:83–94.
- [44] Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; 1996. pp. 169–176.
- [45] Hermitte L, Thomas F, Bougaran R, Martelet C. Contribution of the comonomers to the bulk and surface properties of methacrylate copolymers. *J Colloid Interface Sci* 2004;272:82–9.
- [46] Rupp F, Scheideler L, Geis-Gerstorfer J. Effect of heterogenic surfaces on contact angle hysteresis: dynamic contact angle analysis in material sciences. *Chem Eng Technol* 2002;25(9):877–82.
- [47] Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ. Interfacial Lifshitz–Van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem Rev* 1988;88:927–41.
- [48] Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial. *Advances. J Colloid Interface Sci* 1998;74:69–117.
- [49] Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys cell behaviour. *Mater Sci Eng* 2003;C23:551–60.
- [50] Beringer JP, Orme CA, Gilbert JL. In situ imaging and impedance measurements of titanium surfaces using AFM and SPIS. *Biomaterials* 2003;24(11):1837–52.
- [51] Picart C, Mutterer J, Richert L, Luo Y, Prestwitt GD, Schaaf P, et al. Molecular basis for the explanation of exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc Nat Acad Sci* 2002;99:12531–5.
- [52] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;16(65/1-2):55–63.
- [53] Tsutsui T, Hirokawa Y, Maizumi H. Long-term cultivation of fibroblasts derived from normal gingival tissues of human adults. *J Med Sci Biol* 1973;26(4):169–77.
- [54] Picart C, Sengupta K, Schilling J, Maurstad G, Ladam G, Bausch A, et al. Microinterferometric study of the structure, interfacial potential, and viscoelastic properties of polyelectrolyte multilayer films on a planar substrate. *J Phys Chem B* 2004;108:7196–205.
- [55] Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002;29(5):448–55.
- [56] Richards RG. The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro. *Injury* 1996;27(Suppl 3):SC38–43.
- [57] Jain R, Von Recum AF. Effect of titanium surface texture on the cell-biomaterial interface. *J Invest Surg* 2003;16(5):263–73.
- [58] Jain R, Von Recum AF. Fibroblast attachment to smooth and microtextured PET and thin cp-Ti films. *J Biomed Mater Res* 2004;1(68A/2):296–304.
- [59] Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 2003;12(2):175–81.
- [60] Elbert DL, Herbert CB, Hubbell JA. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir* 1999;15(16):5355–62.
- [61] Zhu Y, Gao C, He T, Liu X, Shen J. Layer-by-layer assembly to modify poly(L-lactic acid) surface toward improving its cytocompatibility to human endothelial cells. *Biomacromolecules* 2003;4(2):446–52.
- [62] Kolasinska M, Warszynski P. The effect of support material and conditioning on wettability of PAH/PSS multilayer films. *Bioelectrochemistry* 2005;66(1/2):65–70.
- [63] Rugge CD, Ahlert RC. Contact angle hysteresis in chlorinated hydrocarbon–water mixtures. *J Phys Chem* 1993;97:8776–9.

4.2. Propriétés de la PEI, base précurseur des FMP sur titane et alliage en nickel-titane

**Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI),
precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films**

**C. Brunot^{a,b}, L. Ponsonnet^c, C. Lagneau^a, P. Farge^{b,d}, C. Picart^e,
et B. Grosgeat^{a,b}**

^aLaboratoire d'Etudes des Interfaces et des Biofilms en Odontologie EA637, Université Lyon1, Rue Guillaume Paradin 69372 Lyon Cedex 08, France

^bHospices Civils de Lyon, SCTD, place Depéret, 69365 Lyon Cedex 07, France

^cLaboratoire Polymères Biopolymères Membranes, UMR CNRS 6522, Université de Rouen, Bd Maurice de Broglie 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

^dDépartement de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine, Université Lyon1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France

^eLaboratoire de Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires, CNRS UMR 5539, Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

Article publié dans Biomaterials 2007,28(4):632-40.

Mots clés français :

Polyéthylèneimine (PEI), titane (Ti), alliage en nickel-titane (NiTi), films multicouches de polyelectrolytes, fibroblastes, ostéoblastes, culture cellulaire.

4.2.1. Contexte du travail

La PEI est un polymère synthétique couramment utilisé dans de nombreux domaines biomédicaux (Ladhari et coll. 2008, Moby et coll. 2008, Vicennati et coll. 2008, Roques et coll. 2009). Beaucoup de travaux expérimentaux sur les biomatériaux fonctionnalisés par des FMP sont réalisés avec de la PEI en couche précurseur qui permettrait un meilleur ancrage des FMP au substrat (Stine et coll. 2009).

Cependant, les propriétés biologiques et la biocompatibilité de cette macromolécule cationique sont assez mal connues. En 2004, lorsque nous débutons nos recherches, la littérature est peu exhaustive à ce sujet et reste très ambiguë. Ainsi, un seul article évoque une certaine forme de toxicité cellulaire (Tryoen-toth et coll. 2002). Au cours de la rédaction de notre protocole expérimental, un autre article est publié et renseigne sur cette cytotoxicité (Moghimi et coll. 2005).

4.2.2. Synthèse détaillée de la recherche

Dans la perspective d'une éventuelle application biomédicale des FMP, et compte tenu des impératifs biologiques liés à la biocompatibilité des biomatériaux, il était indispensable de conduire une étude pour évaluer la biocompatibilité de la PEI utilisée dans la construction des FMP. Un point majeur de notre travail expérimental a été d'étudier la réponse cellulaire avec différentes lignées de cellules sur une couche de PEI déposée sur du Ti et du NiTi. L'objectif de cette recherche expérimentale était de vérifier et d'évaluer la biocompatibilité de la PEI *in vitro* avec des lignées cellulaires humaines.

L'étude a été menée sur du Ti et du NiTi. Une rugosité de surface $Ra=0,3\mu m$ a été choisie conformément à nos précédents travaux afin d'être proche de la rugosité des biomatériaux utilisés en Odontologie. Une couche de PEI a été déposée à la surface des échantillons. La morphologie, l'adhésion, et la prolifération de fibroblastes gingivaux humains et d'ostéoblastes de la lignée MG-63 ont été étudiés.

Les résultats en MEB a montré que les fibroblastes adhéraient et proliféraient sur du Ti ou du NiTi nus mais se développaient plus difficilement sur ces mêmes surfaces recouvertes de PEI (figs.1 et 2 dans Brunot et coll. 2007). Nous avons retrouvé des résultats similaires concernant la réponse ostéoblastique (figs.3 et 4 dans Brunot et coll. 2007). Pour les deux lignées cellulaires étudiées, l'adhésion a pu se réaliser mais les cellules n'ont pas proliféré dès le 2^{ème} jour de culture. A J7, les tapis cellulaires étaient absents ou décollés en masse des surfaces recouvertes de PEI.

Les résultats du test MTT ont été moins explicites que les observations réalisées en MEB. En effet, nous avons noté au MEB une absence de développement cellulaire fibroblastique sur les surfaces recouvertes de PEI alors que le dosage de l'activité mitochondriale (test MTT) ne mettait pas en évidence une différence significative entre la réponse cellulaire sur Ti et NiTi, excepté à J7. Au niveau des ostéoblastes, une nette différence apparaissait après 7 jours de culture cellulaire : la prolifération des cellules sur Ti et NiTi était beaucoup plus élevée que la prolifération des cellules sur la PEI. Cette différence a été mise également en corrélation avec le détachement cellulaire des surfaces observé lors

du pipetage des ostéoblastes sur la PEI. En effet, lors de la préparation des échantillons pour le test MTT, les cellules ostéoblastiques se sont décrochées de la PEI probablement à cause de sa toxicité, entraînant ainsi une perte d'adhérence suivi d'une nécrose cellulaire. Ces résultats étaient en concordance aussi avec les images obtenues en MEB des cellules ostéoblastiques (figs.3 et 4 dans Brunot et coll. 2007). En effet, la formation de tapis cellulaires sur le Ti a été reflétée par la hausse de la DO visible sur les graphiques (fig.5 dans Brunot et coll. 2007). De même, sur la PEI, l'absence de formation d'un tapis cellulaire a été mise en évidence par la faible DO presque identique à chaque jour de culture.

Les résultats ont révélé que la couche de PEI générait une réponse cellulaire défavorable avec une absence de croissance des fibroblastes et des ostéoblastes humains après 7 jours de culture. De plus, l'adhésion des cellules sur le Ti ou le NiTi semblait diminuée avec la présence de PEI. Troyen-Toth et coll. en 2002 avaient observé également une toxicité de la PEI dans une étude portant sur différents types de polyélectrolytes terminaux vis à vis de cellules d'ostéosarcome (SaOS-2) et de fibroblastes à phénotype ostéoblastique (PDL-Fs). Ces propos étaient en corrélation avec les deux lignées cellulaires testées dans ce travail.

La concentration de la PEI à 5 mg/ml de solution de NaCl filtrée a été choisie dans notre étude en adéquation avec les travaux publiés à cette période (Troyen-Toth et coll. 2002, Boulmedais et coll. 2004, Etienne et coll. 2004). Cette concentration pourrait aussi jouer un rôle au niveau de la toxicité de la PEI ; il serait intéressant de renouveler l'étude avec une concentration de PEI moins élevée et/ou plus élevée (par exemple PEI à 1 mg/ml et à 20 mg/ml).

4.2.3. Article scientifique publié : *Biomaterials* 2007,28(4):632-40.

- Impact Factor en 2007 : 6,662.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Biomaterials 28 (2007) 632–640

Biomaterials

www.elsevier.com/locate/biomaterials

Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films

Céline Brunot^{a,b,*}, Laurence Ponsonnet^c, Christelle Lagneau^a, Pierre Farge^{b,d}, Catherine Picart^e, Brigitte Grosogeat^{a,b}

^aLaboratoire d'Etudes des Interfaces et des Biofilms en Odontologie EA637, Université Lyon1, Rue Guillaume Paradin 69372 Lyon Cedex 08, France

^bHospices Civils de Lyon, SCTD, place Depéret, 69365 Lyon Cedex 07, France

^cLaboratoire Polymères Biopolymères Membranes, UMR CNRS 6522, Université de Rouen, Bd Maurice de Broglie 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

^dDépartement de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine, Université Lyon1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France

^eLaboratoire de Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires, CNRS UMR 5539, Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

Received 7 July 2006; accepted 20 September 2006

Available online 16 October 2006

Abstract

Polyethyleneimine (PEI) is a synthetic polymer commonly used as precursor base layer in polyelectrolyte multilayer films. However, the biological properties of this cationic macromolecule are poorly understood. The aim of this experimental investigation was to evaluate *in vitro* the biocompatibility of PEI towards two different human cell lines. The experimental investigation was undertaken on pure titanium (Ti) and nickel–titanium (NiTi) alloy samples with an average surface roughness of $Ra = 0.3 \mu\text{m}$. A biological study was undertaken at day 0 (2 h after seeding), day 2, day 4 and day 7 to observe the cellular response of fibroblasts and osteoblasts cell lines in terms of morphology, adhesion (as observed by scanning electron microscopy), and viability (Mosmann's test). The results showed that PEI can be successfully deposited onto Ti or NiTi alloy, but generates a detrimental cellular response on both substrates as illustrated by a decrease of both fibroblast and osteoblast adhesion and proliferation over a 7-day culture period. These results suggest that PEI is potentially cytotoxic and may not be biocompatible enough in clinical applications using high molecular weight. As a consequence, polyelectrolyte multilayer films, which are promising in prosthesis and implantology fields, could not be coated with PEI at a high molecular weight. A lower molecular weight should be considered or a more biocompatible molecular base as precursor layer of polyelectrolyte multilayer films would be better to use for a good human bio-integration.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Polyethyleneimine; Titanium; Nickel–titanium alloy; Polyelectrolyte multilayer films; Fibroblasts; Osteoblasts

1. Introduction

The build-up of polyelectrolyte multilayer (PEM) films is now a well-established concept and enables surface modification for the coating of biomaterials in clinical applications as implant materials, prosthesis, and artificial organs [1–5]. The principle is based on a layer-by-layer

(LBL) method and the assembly of polyanion/polycation constituting a layer pair [6]. This technique is of particular interest in dental and orthopaedic implantology for tissue engineering and surface functionalisation. Biological properties [7,8] and physico-chemical characteristics [9–12] of PEM-coated device surfaces have been investigated to improve the tissue-implant interface [13–16]. However, these new biocompatible coatings for dental or orthopaedic implants alternating deposition of oppositely charged polyelectrolyte requires the control of several physico-chemical parameters such as layer assembly sequence [17–19], micropatterning [20,21], thickness [22], surface charge [17,23], pH changes [24,25], salt concentration of

*Corresponding author. Faculté d'Odontologie, Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France. Tel.: +33 478778689; fax: +33 478778696.

E-mail addresses: grosogeat@sante.univ-lyon1.fr, cbrunot.gohin@wanadoo.fr (C. Brunot).

polymer [26], roughness [22,27], biodegradability [28–30] and more importantly biocompatibility [31–36]. Some ordinary biodegradable polyelectrolytes are currently used for biological applications. Recent reports have described polyethyleneimine (PEI) as a commonly used polyelectrolyte in *in vitro* experiments and as a precursor base layer for multilayer films [5,7,34,36,37]. PEI is a cationic synthetic polymer but its biological properties are poorly understood and it is known to exhibit some form of toxicity towards different cell lines [37,38]. Multilayer films tend to exhibit some degradation [30] thus exposing the PEI sub-layer in contact with *in vivo* tissue cells; in oral implantology, this may compromise the functional integration of the implant with the surrounding bone. The aim of this present investigation is to evaluate the potential cytotoxicity of PEI towards buccal cells, and to compare cell morphology and cell viability on both coated and non-coated PEI metallic samples.

2. Materials and methods

2.1. Titanium and nickel–titanium (NiTi) alloy samples preparation

Pure titanium (*cp*-Ti) (provided by Timet[®]Savoie company, Titanium Metal Corporation) and NiTi alloy (provided by NiTi France[®]) were used. All samples had a squared form with a side of 1.1 cm for Ti samples and 0.6 cm for NiTi alloy samples. Before use, a surface polishing was carried out manually with P600 abrasive discs (Buehler[®] SiC Grinding Paper) on one face/surface of each sample to obtain a surface roughness of $R_a = 0.3 \mu\text{m}$. A roughness test was undertaken with the Perthometer C5D (Perthen) to confirm a reproductive surface quality before PEI deposition. A cleaning/degreasing treatment was carried out by a succession of different ultrasonic baths to eliminate all residual surface impurities: 10 mn with acetone then abundant rinsing in ultrapure water filtered with a MilliQ-plus system (Millipore 18.2 M Ω), followed by 10 mn with absolute ethanol and abundant rinsing with ultrapure water, and finally completed by 10 mn with ultrapure water and then dried with nitrogen gas. To confirm the results, samples were recycled, polished again according to the preset protocol on the same face/surface (mechanical cleaning) and cleaned again according to the above method (chemical cleaning).

2.2. PEI deposition

PEI (Molecular weight = 70 kDa, 50 wt% solution in water) and sodium chloride (NaCl, purity ~99%) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). The PEI solution was prepared by dissolution of the polyelectrolyte powder in 0.15 M NaCl at pH 6.5 (using ultrapure filtered water) at a final concentration of 5 mg/ml. Metallic samples were put in 24-well tissue culture plates and the PEI was absorbed for 10 mn (400 μl in each well). Each well was washed twice with a NaCl solution (3 min each one). Then, samples were rinsed in ultra-pure water for 1 h to eliminate the NaCl traces that could modify the results and dried with nitrogen gas. Finally, control samples and PEI-coated samples were placed in 24-well tissue culture plates (Nunc) and UV sterilized (UVA 100–200 HPV, honle UV technology, 1000 W) for 10 min and stored at room temperature until they were used.

2.3. Cell study

Fibroblast and osteoblast cells were used to evaluate the biological behaviour and the cellular response to PEI on functionalized metallic

surfaces. Biocompatibility parameters included cell morphology as studied by scanning electron microscopy (SEM) and cell viability as measured by Mosmann's colorimetric study [39]. Cell cultures were maintained for 7 days and studied at 2 h of adhesion at day 0 (D0), at day 2 (D2), at day 4 (D4), and day 7 (D7).

2.3.1. Fibroblast culture

Human periodontal fibroblasts were derived from a primary cell culture originating from the coronary bag of a wisdom tooth. Human fibroblasts were obtained by the explant technique [40] after the consent of an informed patient. Explant cultures were obtained from biopsies of clinically healthy human gingival tissues, removed in the course of oral surgery (wisdom tooth removal). Routine histological examination of randomly selected specimens showed no inflammation signs. Immediately following removal, the biopsy was stored in a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Eurobio, Les Ulis, France) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (AbCys, Paris, France) supplemented with 100 U/ml penicillin (P) and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (S) (Boehringer Mannheim, Germany), and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone (F) (Gibco, Paisley, UK). The explant was then cut into small fragments of 2 mm³, placed on plastic culture dishes and maintained in a DMEM + 10% FBS + P/S mixture + F, and finally incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Every other day, the culture medium was changed. When primary cultures were confluent, secondary cultures were realised. A rinsing of primary cultures was carried out with a phosphate buffered saline (PBS) and P/S mixture, the cells were then subdivided by trypsinisation using trypsin-EDTA solution (trypsin 0.05% and ethylene-diaminetetraacetic acid 0.02%, Eurobio). The cellular seeding was started from these secondary cultures. For each handling, the number of cells was determined with an electronic cell counter (Beckman Coulter Z1, Fullerton-England) and concentration was adjusted at about $10\text{--}15 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$ onto substrates placed in standard 24-well tissue culture plates (so 100 μl cellular suspension for Ti samples and 70 μl cellular suspension for NiTi alloy samples).

2.3.2. Osteoblast culture

The osteoblast cells were MG63 osteoblast-like types. The cells were obtained after collagenase digestion as described by Nefussi et al. [41]. After rinsing the bone biopsy in PBS, the bone fragments were digested 2 h at 37 °C and shaken in a serum-free culture medium DMEM + HamF12 (Eurobio) (vol/vol) with 1 mg/ml type I collagenase (Sigma Aldrich). The cells were then detached by gentle pipeting and the cell suspension was centrifuged and rinsed three times in the complete culture medium DMEM + HamF12 + 10% FBS + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid (Sigma Aldrich) + P/S mixture. Then, cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After confluence, cells were harvested in trypsin-EDTA solution (trypsin 0.05% and ethylene-diaminetetraacetic acid 0.02%) and counted with the electronic cell counter. Finally, the cells were seeded on the substrates at a final concentration of $10\text{--}15 \times 10^3 \text{ cells}/\text{cm}^2$.

2.4. Scanning electron microscopy

Cellular morphology was observed by SEM at each point-time of the culture. The samples were routinely prepared according to the following method. Briefly, a fast rinsing was carried out with a PBS solution (pH 7.2) and samples were fixed 30 min at 4 °C with a glutaraldehyde buffer (2.5%) (Sigma Aldrich) mixed 1/1 with a sodium cacodylate buffer (CaCO₃ 0.4 M) (Sigma Aldrich). Samples were rinsed for 30 min in a CaCO₃ buffer (0.2 M) and post-fixed 30 min at 4 °C with an osmium tetroxide solution (OsO₄, 1%) added with a CaCO₃ buffer (0.2 M). The final rinse was carried out with distilled water at room temperature. Samples were subsequently rinsed in PBS and dehydrated in sequential-graded concentrations of ethanol-acetone solutions (Carlo Erba, France) (30/70, 50/50, 70/30) for 5 min each and immersed for 5 min in pure acetone. Following evaporation of acetone, the slips were then mounted on copper stubs with silver paint. A gold-palladium cathode-sputtering (0.1 mbar) (Balzers) was made under constant current of 25 mA for 2 min 30 s. Finally, the gold-palladium-coated

samples were examined under a Hitachi S800 scanning electron microscope (Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 5 kV (Technological Microstructures Center, University of Lyon, France).

2.5. Test of cell viability (MTT assay)

A quantitative colorimetric test was performed after each day of culture to characterize cellular metabolism (viability) and cell proliferation [39]. The viable cells have a mitochondrial enzymatic activity that transforms the methylthiazol tetrazolium (MTT) into insoluble formazan precipitates because of a dehydrogenase succinate enzymatic activity. The MTT filtered solution (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (5 mg/ml) (Sigma Aldrich) was added to the cell cultures at the following stand points after seeding: 2 h (D0), second day (D2), fourth day (D4) and seventh day (D7). Each day, wells were incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The medium was then drawn out and the dark-blue crystals left in the wells were dissolved in a 500 µl of ethanol-dimethylsulfoxide solution (vol/vol) (DMSO) (Amresco, Solon, OH, USA). The optical density (OD) was measured at 570 nm using a 96-well micro-plate reader (Becton Dickinson, Lincoln Park, USA) in a spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). The blank reference was taken from an ethanol-DMSO solution alone. The value of the OD was proportional to the cellular activity and thus reflects a measure of the cell viability. In addition, the absorbance of the dye varied linearly with the number of viable cells per well.

2.6. Statistical analysis

The collected data of Mosmann's test were treated with an Excel software version Microsoft 2000. For each handling, coated samples and controls, all graphs showed the measured values and their standard deviations. The basic statistics were calculated using a Stat-View software (version 5.0) (Hopper Institute Inc Cary, NC, USA). The Student's statistical test was used with non-paired series (unpaired *t*-test) for comparisons of the different surfaces. Probabilities of correlation using the

Pearson's coefficient (*p*) considered correct *p* values below 0.05 as a statistically significant threshold.

3. Results

3.1. Cell morphology (SEM)

3.1.1. Fibroblast cells

The SEM fibroblast results are shown in Figs. 1 and 2 at each point-time of cell cultures. At the surface of Ti control samples (Fig. 1a), many fibroblasts adhered as soon as 2 h after seeding and displayed a spindle-shaped or elongated morphology. Cells were numerous and had a normal fusiform aspect with many characteristic dendritic digitations. At D2 (Fig. 1b), the fine and long filopodia formed a cellular group along the same direction of the polished grooves. At D4 (Fig. 1c), fibroblastic cells were largely confluent, intimately intermingled, and at D7 they tangled up to the surface at D7 (Fig. 1d). Similar results were noted for the NiTi alloy samples at the same point-time of the 7-day cell culture period (Figs. 2a–d).

On Ti (Fig. 1a') and NiTi (Fig. 2a') surfaces coated by PEI, cells demonstrated a characteristic fibroblastic cellular form at D0 similar to that of control samples. At D2 (Figs. 1b' and 2b'), fibroblasts were numerous and exhibited some dendritic digitations with a fusiform typical-like morphology. At D4 (Figs. 1c' and 2c'), both cell lines showed the first signs of a decreased cellular attachment with the PEI-coated substrates. Although some cellular clusters are still attached to the surfaces, they

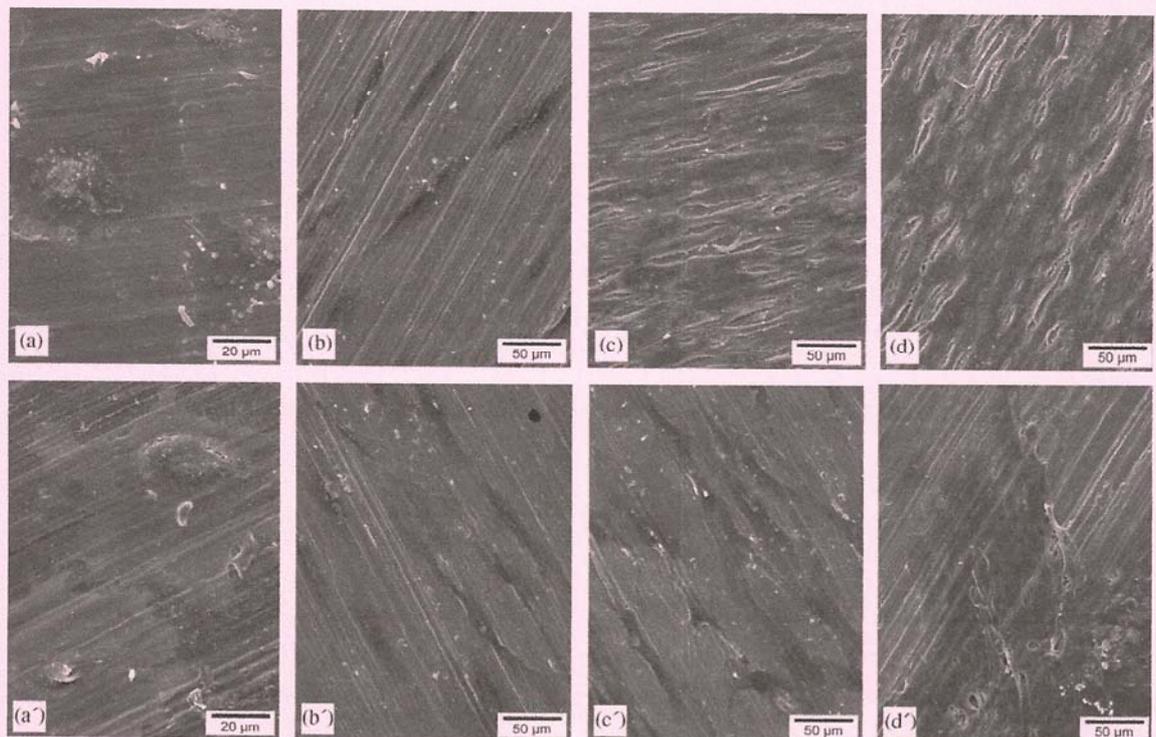


Fig. 1. Scanning electron micrographs of the Ti samples (Figs. 1a–d) and Ti+PEI-coated samples (Figs. 1a'–d') with fibroblasts at D0 (panel a–a', × 1000), D2 (panel b–b', × 400), D4 (panel c–c', × 400) and D7 (panel d–d', × 400).

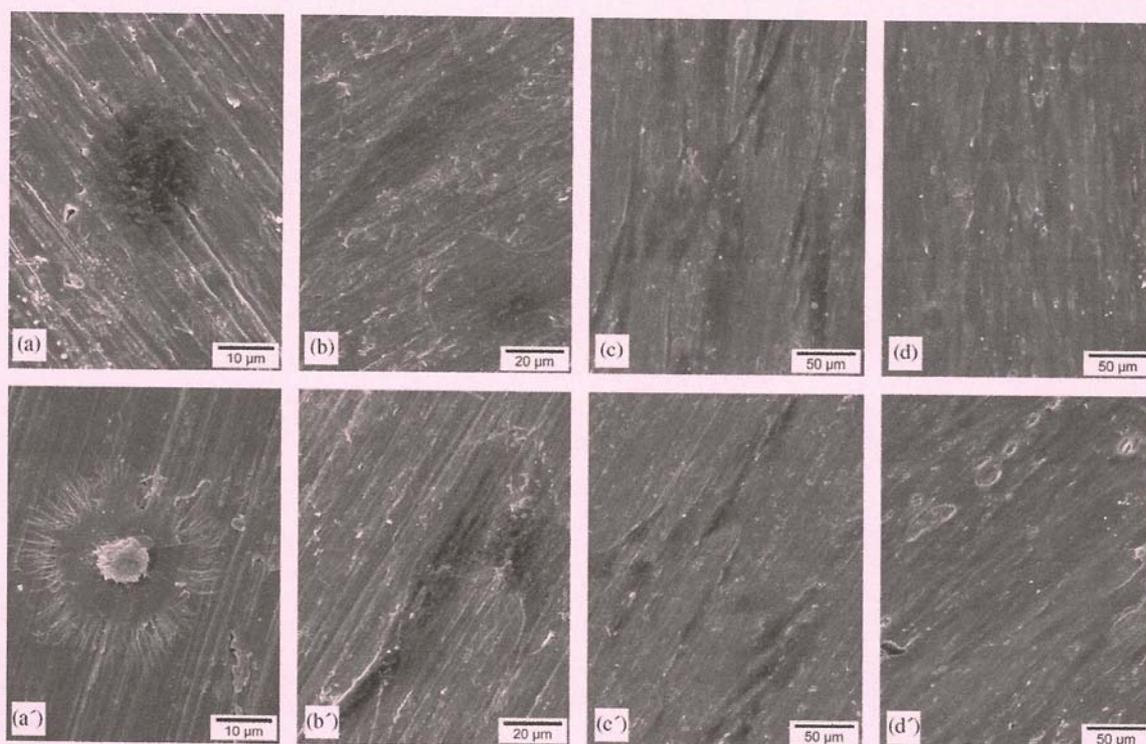


Fig. 2. Scanning electron micrographs of the NiTi samples (Figs. 2a–d) and NiTi+PEI-coated samples (Figs. 2a'–d') with fibroblasts at D0 (panels a and a', $\times 1000$; a', $\times 2000$), D2 (panels b–b', $\times 1000$), D4 (panels c–c', $\times 400$) and D7 (panels d–d', $\times 400$).

appear to unhook and leave the substrate surfaces (Figs. 1d' and 2d'). This appears more significant for Ti coating PEI than for NiTi coating PEI. At D7, this remains more severe for Ti coating PEI (Figs. 1a'–d') than for NiTi alloy coating PEI (Figs. 2a'–d').

3.1.2. Osteoblast cells

The SEM osteoblast results are shown in Figs. 3 and 4 at each point-time of culture. At D0, most of the osteoblasts on all surfaces display a circular cell shape with fine and long filopodia (Figs. 3a, a', 4a and a'). Osteoblasts adhered onto the substrates by the way of thin cytoplasmic digitations. At D2, elongated cells, as well as spread multipolar osteoblasts, were seen in both samples, whether coated by PEI or not (Figs. 3b, b', 4b and b'). At D4, no difference was seen in regards to the osteoblast morphology either on PEI-coated Ti or NiTi samples. Cells extended preferentially along the direction of the polished grooves. Many cells formed a cellular unity which exhibited a flat morphology. Cellular growth was important and the cell coverage was denser for control samples than for the PEI-coated material surfaces. At D7, cellular confluence was reached but pictures of PEI-coated samples clearly demonstrated signs of a decreased attachment and many cellular clusters were no longer adherent to the PEI coating (Figs. 3d' and 4d'). Surface grooves were visible in the PEI-coated samples as compared to control samples where a thick cellular group was present (Figs. 3d and 4d).

3.2. Cell viability (Mosmann's test)

3.2.1. Fibroblast cells

The behaviour of the cultured fibroblasts on the surface is shown in Fig. 5a. At D0, OD was similar for the bare surfaces and for the PEI-coated surfaces. This observation remains valid at D2. At D4, the high values of OD for bare surfaces were opposed to the low value for surfaces with PEI for both metallic biomaterials. In contrary to PEI-coated surfaces, OD increased for the Ti and NiTi samples until D7. Cells cultured on Ti control samples showed high rates of proliferation and therefore demonstrated a high cell density than the NiTi control substrates.

3.2.2. Osteoblast cells

At D0, D2 and D4, similar results of OD were noted for controls and PEI-coated samples on both metallic biomaterials (Fig. 5b). At D7, cell proliferation increased compared to D4. OD readings were higher for control samples than for PEI-coated samples (both Ti and NiTi alloy samples). Osteoblast cells showed a higher proliferation rate and cell density on Ti control samples as compared to NiTi control samples. The OD was significantly higher for osteoblasts cultured on bare surfaces.

4. Discussion

The aim of this study was to investigate the cytotoxicity of PEI in monolayer in order to test the possible use of PEI

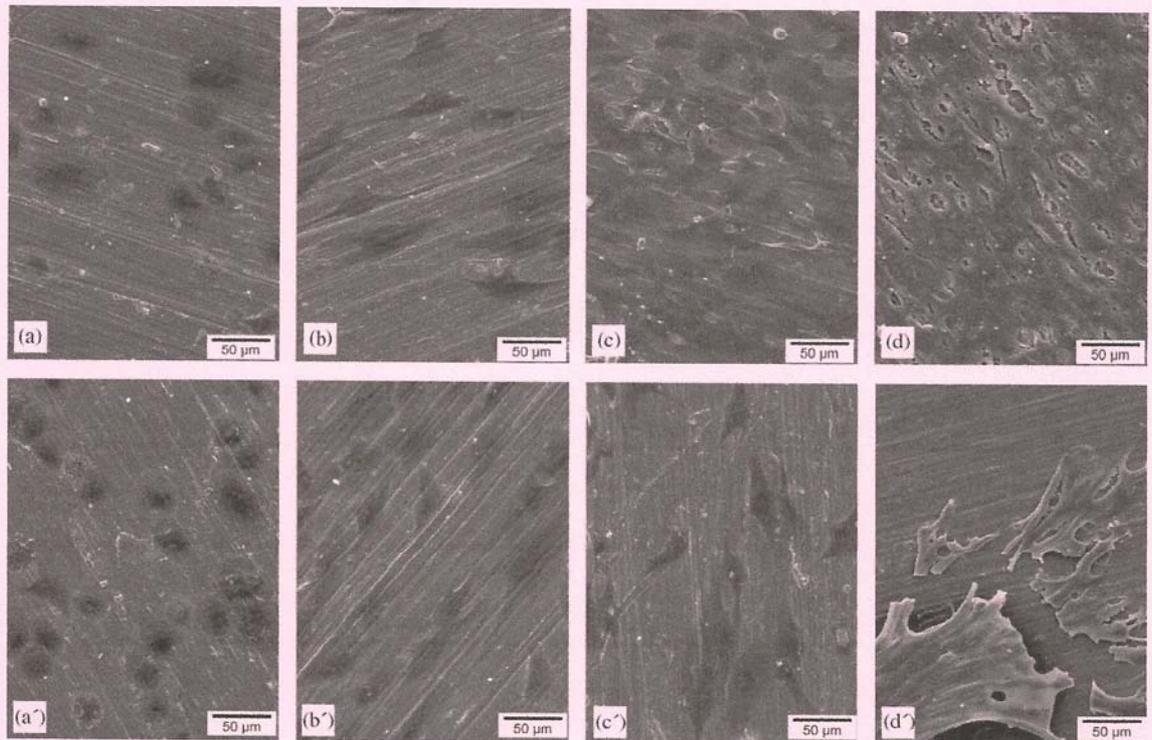


Fig. 3. Scanning electron micrographs of the Ti samples (Figs. 3a–d) and Ti+PEI-coated samples (Figs. 3a'–d') with osteoblasts at D0 (panel a–a', $\times 400$), D2 (panel b–b', $\times 400$), D4 (panel c–c', $\times 400$) and D7 (panel d–d', $\times 400$).

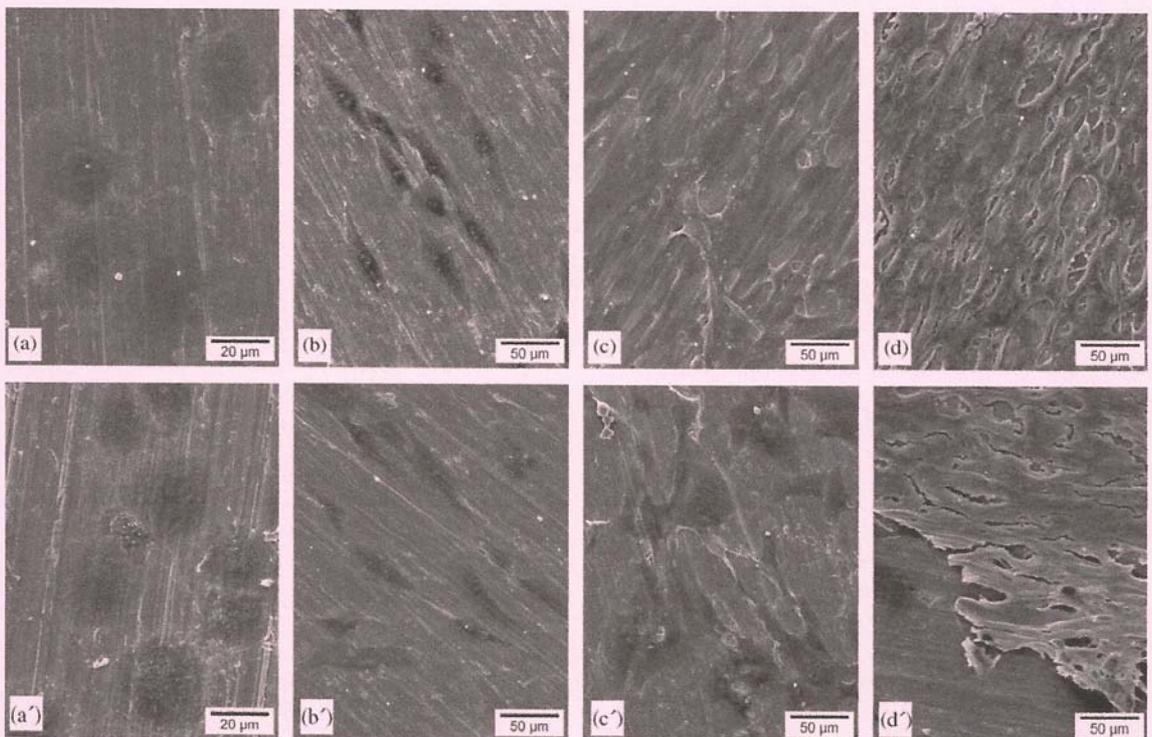


Fig. 4. Scanning electron micrographs of the NiTi samples (Figs. 4a–d) and NiTi+PEI-coated samples (Figs. 4a'–d') with osteoblasts at D0 (panel a–a', $\times 1000$), D2 (panel b–b', $\times 400$), D4 (panel c–c', $\times 400$) and D7 (panel d–d', $\times 400$).

as a precursor base layer in PEM films on Ti or NiTi. Besides its wide use in polyelectrolyte films, PEI has been considered for experimental purposes such as immunisa-

tion [42] and as gene therapy [43]. Although PEI is commonly used as precursor base layer to build PEM films, few studies have investigated the rationale for its

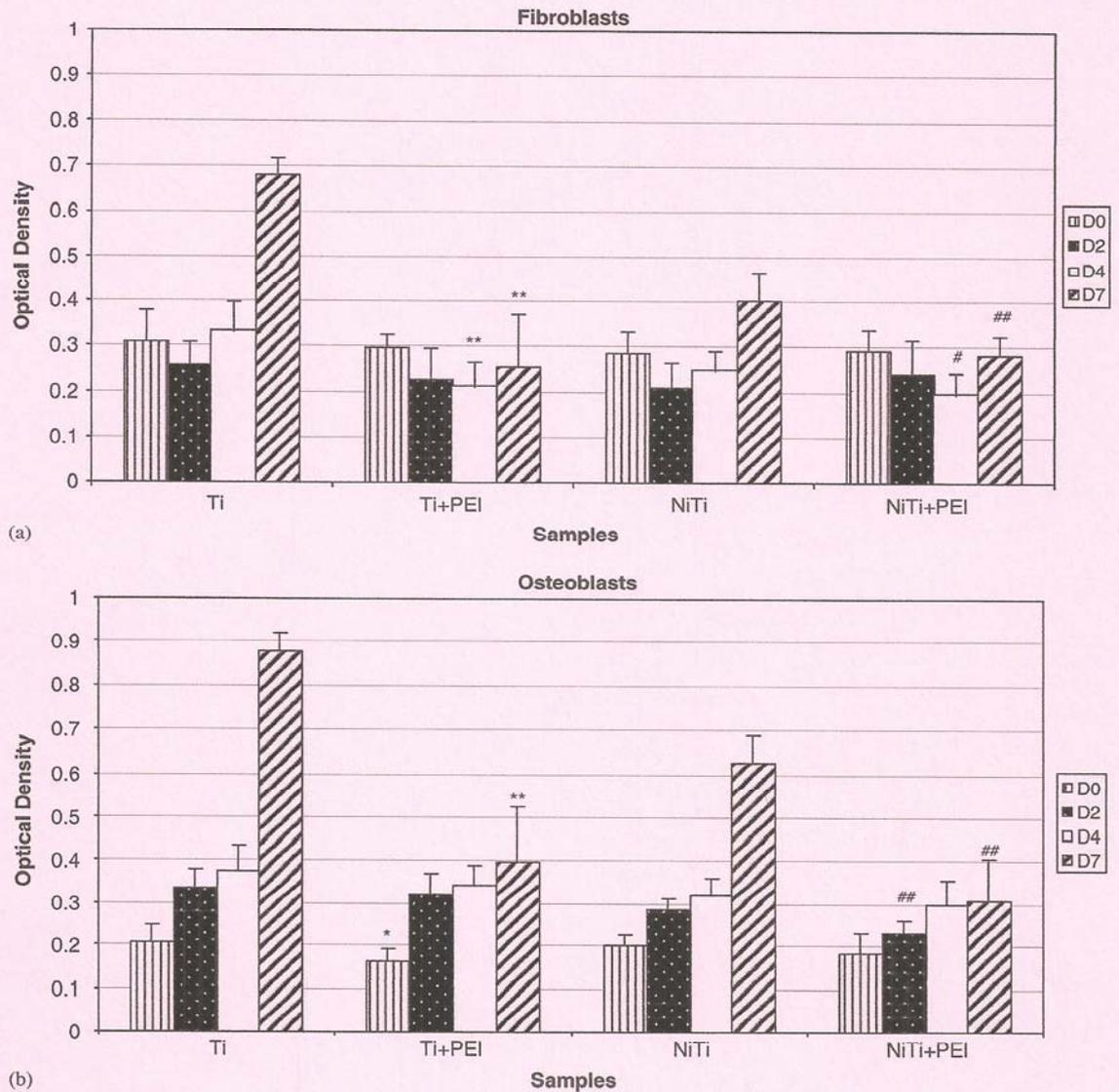


Fig. 5. Fibroblast viability (Fig. 5a) and osteoblast viability (Fig. 5b) on Ti, PEI-coated Ti, NiTi alloy and PEI-coated NiTi alloy. The results are the average of two independent experiments. Cellular mitochondrial activity was measured at D0, D2, D4 and D7 and the values are the average of 16 samples per day. The optical density (OD) was measured at 570 nm. Student's *t*-test: **p*<0.05 and ***p*<0.001, Ti+PEI versus Ti; #*p*<0.05 and ##*p*<0.001, NiTi+PEI versus NiTi. The error bars represent the standard deviations for each point-time of culture (see Section 2).

common use. Our data demonstrate that PEI appears to adsorb well on Ti and NiTi substrates, as previously demonstrated for other biomaterials such as glass [7,36,37], plastic and composite [5], silicone or silica. This would be mediated by the creation of interatomic connections (Van der Waals's connections and hydrogen bonds) and electrostatic bonds [4]. Some authors recommend adsorption of PEI by a covalent chemical process in order to increase the anchorage of the upper layer; our results show that a plain non-covalent deposition may be enough to obtain a good anchorage of PEI on Ti and NiTi alloy surfaces.

The cellular study was undertaken using human fibroblasts in vitro in order to simulate the intimate contact of the dental implant collar around the muco-gingival tissue in the buccal cavity. Indeed, fibroblast cells concern the trans-mucosal part of the dental implant which carries the

conjunctivo-epithelial attachment [44] as opposed to the osteoblast cells which simulate osseointegration of implants in the alveolar bone. SEM analysis and MTT results are in accordance with previous results found in the literature on the biocompatibility and biofunctionality of Ti [45–47] and NiTi [50] using fibroblasts and osteoblasts cell cultures. As soon as 2 days after seeding, the fibroblasts display a preferential orientation along the direction of the rough surface grooves. SEM images show parallel cells streaks which appear to cover the notches of the surface previously described [48]. Other studies demonstrate that osteoblast cell cultures were not altered, when performed on cp-Ti surfaces with various surface treatments [51–54]. As opposed to bare surfaces, coated samples clearly resulted in modified morphological cellular aspects. When cell lines were grown on PEI-coated samples, fibroblasts

showed normal shaped with many characteristic dendritic digitations showing a good adhesion at D0, but the cellular morphology aspects of osteoblasts appear to be modified. However, at D7, neither fibroblast nor MG63 osteoblast cells reached confluence on PEI. Both cell lines showed clearly different morphological aspects and advanced apoptotic condensation or cell fragmentation at the last day of culture, probably due to the increasing cytotoxicity of the PEI base layer. Notably, fibroblast cells did not preserve their normal spindle-like shapes, whereas osteoblast cells were clustered and linked by thin cell extensions. While PEI allows a cell adhesion in the first hours of culture, it does not allow further normal cell proliferation. Although many fibroblasts are present at the surface initially they further appear to retrieve themselves from the PEI-coated surface. On the other hand, osteoblast cellular clusters were still present but exhibit some departure from the surface and demonstrate an inhibition of their cell multiplication.

On the seventh day of culture, results of OD demonstrate that PEI is unfavourable for cell growth. The cytotoxicity of PEI involves a high inhibition of cell proliferation between D4 and D7 for Ti, and to a lesser extent for NiTi. For fibroblasts, the OD, which is linearly correlated with the cell proliferation, was significantly higher for both cell types on control samples than for PEI-coated samples. The data of the OD for PEI-coated samples were approximately constant until D7 indicating that the PEI layer does not favor cell proliferation but may induce cell apoptosis. Interestingly, osteoblasts still retain a higher cell proliferation activity at D4 than at D2, this may be related to the stronger metabolic rate of osteoblast as compared to fibroblast, which results in an increased cellular cytotoxicity of PEI. While cell adhesion does not appear to be modified by PEI, cell viability is altered by the presence of PEI, as illustrated by our data at D7. A differential sensibility is noted for fibroblasts than for osteoblasts which appeared in the initial steps less sensitive to PEI.

The cytotoxicity of PEI is known to be molecular weight-dependent. Morimoto's work showed that high molecular weight of PEI (70 kDa) is more cytotoxic than low molecular weight (18 kDa) [55]. The degree of this toxicity also depends on the experimental cellular type [38,56–58]. Lakard studied rat neuronal cell lines and found that this cell line proliferates faster on PEI coating than on reference surfaces [56]. Neuronal cells would have a greater fold expansion on PEI which could be useful as a coating surface to cultivate neuronal cells. Vleggert-Lankamp showed that attachment of human Schwann cells for peripheral nerve regeneration was satisfactory on PEI and comparable to other coatings, indicating that this factor is not of major consideration for a suitable coating [57]. Other reports conclude that PEI offers biocompatibility, low immunogenicity and minimal cytotoxicity [58]. Our findings are thus in accordance with the studies of Tryoen-Toth's [37] and Moghimi's [38] works and demonstrate that this PEI is clearly not biocompatible when used as a precursor base layer of polyelectrolyte films.

Finally, the concentration of PEI may account for the biocompatibility of this compound and the increase or the decrease of PEI concentration may modify its biological properties. Using a PEI concentration of 0.5 mg/ml, Carrigan developed a successful rapid and affordable system of real-time immune monitoring for diagnostic applications in sepsis [59]. In Tryoen-Toth's work [37], the experimental study was undertaken with a PEI concentration of 5 mg/ml and results show that this polymer is cytotoxic toward osteoblast-like SaOS-2 cells (derived from an osteosarcoma) and human fibroblasts (derived from periodontal ligament). PEI concentration lower than 5 mg/ml may compromise the quality of the precursor base layer of polyelectrolyte films. Although, clinical applications for orthopaedics or dental implant should not safely be considered with such high PEI concentration.

5. Conclusion

Taken together, our results confirmed the hypothesis that PEI is potentially cytotoxic. Furthermore, the development of PEI-coated biomaterials must be viewed in light of its biocompatibility and potential clinical applications in the field of implantology.

While polyelectrolytes are a promising coating in the biomaterial fields, PEM films embedding PEI precursor base layer for biomaterials, and its use as precursor base layer in polyelectrolyte films, should be considered carefully. It would be better to look for a molecular base other than PEI or to use PEI at lower molecular weight and lower concentration to be sure of its future human bio-integration.

Acknowledgments

The authors are very thankful to Timet[®]Savoie and NiTi[®]France company for providing metallic samples to carry out this research.

References

- [1] Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol* 1999;17:409–21.
- [2] Ai H, Jones SA, Lvov YM. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochem Biophys* 2003;39(1):23–43.
- [3] Fussell G, Cooper S. Synthesis and characterization of acrylic terpolymers with RGD peptides for biomedical applications. *Biomaterials* 2004;25(15):2971–8.
- [4] Richert L, Lavalle P, Payan E, Shu XZ, Prestwich GD, Stoltz JF et al. Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* 2004;20(2):448–58.
- [5] Etienne O, Picart C, Taddei C, Keller P, Hubsch E, Schaff P, et al. Polyelectrolyte multilayer film coating and stability at the surfaces of oral prosthesis base polymers: an in vitro and in vivo study. *J Dent Res* 2006;85(1):44–8.
- [6] Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* 1997;277:1232–7.

- [7] Boulmedais F, Frisch B, Etienne O, et al. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* 2004;25(11):2003–11.
- [8] Fu J, Ji J, Yuan W, Shen J. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* 2005;26(33):6684–92.
- [9] Andrade J, Smith LM, Gregonis DE. The contact angle and interface energetics, surface and interfacial aspects of biomedical polymers, Vol. 1. New York and London: Plenum Press; 1983. p. 249–89.
- [10] Bell JP, Schmidt RG, Malofsky A, Mancini D. Controlling factors in chemical coupling of polymers to metals. *J Adhesion Sci Technol* 1991;5(10):927–44.
- [11] Chen J, Luo G, Cao W. The study of layer-by-layer ultrathin films by the dynamic contact angle method. *J Colloid Interface Sci* 2001; 238:62–9.
- [12] Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblasts. *Biomaterials* 2003;24(25):4663–70.
- [13] Albrektson T. Signification clinique et expérimentale de l'ostéointégration. Une actualisation des critères de succès et d'évaluation longitudinale. *J Parodontol* 1991;10(2):115–30.
- [14] Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants—(I) Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 1998;106:527–51.
- [15] Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants—(II) Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106:721–64.
- [16] Eisenbarth E, Velten D, Schenk-Meuser K, et al. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomol Eng* 2002;19(2–6):243–9.
- [17] Ladam G, Schaad P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 2001;16(3):1249–55.
- [18] Picart C, Lavalle P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, et al. Buildup mechanism for poly-L-lysine/hyaluronan acid films onto a solid surface. *Langmuir* 2001;17(23):7414–24.
- [19] Kim HJ, Lee K, Kumar S, Kim J. Dynamic sequential layer-by-layer deposition method for fast and region-selective multilayer thin film fabrication. *Langmuir* 2005;30, 21(18):8532.
- [20] Yang SY, Rubner MF. Micropatterning of polymer thin films with pH-sensitive and cross-linkable hydrogen-bonded polyelectrolyte multilayers. *J Am Chem Soc* 2002;124:2100–1.
- [21] Antunes FE, Marques EF, Gomes R, Thuresson K, Lindman B, Miguel MG. Network formation of cationic vesicles and oppositely charged polyelectrolytes. Effect of polymer charge density and hydrophobic modification. *Langmuir* 2004;25, 20(11):4647–56.
- [22] Lavalle Ph, Gercely C, Cuisinier FJ, Decher G, Schaaf G, Voegel JC, et al. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: a in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* 2002;35(11):4458–65.
- [23] Mendelsohn JD, Yang SI, Hiller J, Hochbaum AI, Rubner MF. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules* 2003;4:96–116.
- [24] Gergely C, Bahi S, Szalontai B, Flores H, Schaaf P, Voegel JC, et al. Human serum albumin self-assembly on weak polyelectrolyte multilayer films structurally modified by pH changes. *Langmuir* 2004;22, 20(13):5575–82.
- [25] Burke SE, Barrett CJ. pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules* 2003; 4(6):1773–83.
- [26] Buron CC, Filiatre C, Membrey F, Peerot H, Foissy A. Mass and charge balance in self-assembled multilayer films on gold. Measurements with optical reflectometry and quartz crystal microbalance. *J Colloid Interface Sci* 2006;296(2):409–18.
- [27] Picart C, Ladam G, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, et al. Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: a comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. *J Chem Phys* 2001;115(2):1086–94.
- [28] Sabot A, Krause S. Simultaneous quartz crystal microbalance impedance and electrochemical impedance measurements Investigation into the degradation of thin polymer films. *Anal Chem* 2002;15(74):3304–11.
- [29] Ren K, Wang Y, Ji J, Lin Q, Shen J. Construction and deconstruction of PLL/DNA multilayered films for DNA delivery: effect of ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;46(2):63–70.
- [30] Garza JM, Jessel N, Ladam G, Dupray V, Muller S, Stoltz JF, et al. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartment films. *Langmuir* 2005;21(26):12372–7.
- [31] Ai H, Meng H, Ichinose I, Jones S, Mills D, Lvov Y, et al. Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *J Neurosci Methods* 2003;128:1–8.
- [32] Pitt WG, Morris RN, Mason ML, Hall MW, Luo Y, Prestwich G. Attachment of hyaluronan to metallic surfaces. *J Biomed Mater Res* 2004;68A:95–106.
- [33] Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux F, Declercq G, et al. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* 2004;5(2):284–94.
- [34] Zhu H, Ji J, Shen J. Construction of multilayer coating onto poly(L-Lactide) to promote cytocompatibility. *Biomaterials* 2004; 25(1):109–17.
- [35] Vodouhê C, Schmittbuhl M, Boulmedais F, et al. Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on osteoblast growth. *Biomaterials* 2005;26(5):545–54.
- [36] Mhamdi L, Picart C, Lagneau L, Othmane A, Grogogeat J, Jaffrezic-Renault N, et al. Study of the polyelectrolyte multilayer thin films properties and correlation with the behavior of the human gingival fibroblasts. *Mater Sci Eng* 2006;26:273–81.
- [37] Tryocn-Toth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chlubek A, et al. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res* 2002; 60(4):657–67.
- [38] Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska-Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther* 2005;11(10):990–5.
- [39] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;16, 65(1–2):55–63.
- [40] Tsutsui T, Hirokawa Y, Maizumi H. Long-term cultivation of fibroblasts derived from normal gingival tissues of human adults. *J Med Sci Biol* 1973;4(26):169–77.
- [41] Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Boulekbache H, Forest N. Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagen digestion. *Differentiation* 1985;29:160–8.
- [42] Oster CG, Kissel T. Comparative study of DNA encapsulation in PLGA microparticles using modified double emulsion methods and spray drying techniques. *J Microencapsul* 2005;22(3):235–44.
- [43] Katz M, Roth C, Dunn M. Factors that influence transgene expression and cell viability on DNA-PEI-seeded collagen films. *Tissue Eng* 2005;11(9–10):1398–406.
- [44] Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002;29(5):448–55.
- [45] Richards RG. The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro. *Injury* 1996;27(Suppl 3):SC38–43.
- [46] Feng B, Weng J, Yang B-C, Qu S-X, Zhang X-D. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblasts. *Biomaterials* 2003;24(25):4663–70.
- [47] Jain R, Von Recum AF. Effect of titanium surface texture on the cell attachment to biomaterial interface. *J Invest Surg* 2003;16(5):263–73.
- [48] Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lisowski M, et al. Relationship between surface properties (roughness and wettability) of titanium and titanium alloys cell behaviour. *Mater Sci Eng* 2003;C23:551–60.

- [49] Jain R, Von Recum AF. Fibroblast attachment to smooth and microtextured PET and thin cp-Ti films. *J Biomed Mater Res* 2004;1, 68A(2):296–304.
- [50] Wirth C, Comte V, Lagneau C, Exbrayat P, Lissac M, Jaffrezic-Renault N, et al. Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts. *Mater Sci Eng* 2005;C25:51–60.
- [51] Lauer G, Wiedmann-Al-Ahmad M, Otten JE, Hubner U, Schemelzsen R, Schilli W. The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2001;22(20):2799–809.
- [52] Satsangi A, Satsangi N, Glover R, Satsangi RK, Ong JL. Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface. *Biomaterials* 2003;24(25):4585–9.
- [53] Guizzardi S, Galli C, Martini D, et al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol* 2004;75(2):273–82.
- [54] Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, Joss U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004;25(4):625–31.
- [55] Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y, Fumoto S, et al. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Molec Ther* 2003;7(2):254–61.
- [56] Lakard S, Herlem G, Propper A, Kastner A, Michel G, Vallès-Villarreal N, et al. Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. *Bioelectrochemistry* 2004;62(1):19–27.
- [57] Vleggert-Lamkamp CL, Pêgo AP, Lakke EA, Deenen M, Marani E, Thomeer RT. Adhesion and proliferation of human Schwann cells on adhesive coatings. *Biomaterials* 2004;25(14):2741–51.
- [58] Gherghi IC, Girousi STh, Thanou M, Voulgaropoulos AN, Tzimou-Tsitouridou R. Voltammetric study of interaction between polymers (PEI and TMO) and pDNA on a hanging mercury drop electrode. *J Pharm Biomed Anal* 2005;1, 39(1–2):177–80.
- [59] Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M. Rapid three-dimensional biointerfaces for real-time immunoassay using hIL-18BP α as a model antigen. *Biomaterials* 2005;26(35):7514–23.

4.3. Stérilisation des FMP sur titane et alliage en nickel-titane

Sterilization of polyelectrolyte multilayer films coating titanium and nickel-titanium alloys by autoclave methods

**C. Brunot^{a,b}, L. Mora-Ponsonnet^c, D. Décorêt^a, B. Beaugiraud^d, A. Brioude^a,
et B. Grosgeat^{a,e}**

^aLaboratoire des Multimatériaux et des Interfaces, UMR CNRS 5615, Faculté d'Odontologie, Université de Lyon, Université Lyon 1, Rue Guillaume Paradin F-69372 Lyon Cedex 08, France

^bFaculté d'Odontologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2 rue du Général Koenig, 51100 Reims

^cLaboratoire Polymères Biopolymères Membranes, CNRS UMR 6522, Université de Rouen, Bd Maurice de Broglie F-76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

^dLaboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes, Ecole Centrale de Lyon, 36 avenue Guy de Collongue, 69134 F-Ecully Cedex, France

^eHospices Civils de Lyon, SCTD, 6-8 Place Déperet, F-69365 Lyon Cedex 07, France

Article en cours d'élaboration.

Mots clés français :

Titane (Ti), alliage de nickel-titane (NiTi), films multicouche de polyélectrolytes, stérilisation, FTIR, Raman, fibroblastes, culture cellulaire.

4.3.1. Contexte du travail

Les conditions physico-chimiques, auxquelles les biomatériaux sont soumis lors d'un procédé de stérilisation, ne doivent pas dégrader ou détériorer les états de surface. Toujours dans la perspective d'une application médicale des biomatériaux métalliques fonctionnalisés par des FMP, ce travail a pour objectif d'étudier si les procédés de stérilisation pourraient avoir une influence sur l'intégrité des films.

Plusieurs approches ont été développées dans notre protocole expérimental :

- Un test qualitatif des différentes méthodes de stérilisation a été réalisé en collaboration avec M^{me} Dominique Décorêt.

- Une analyse des surfaces par spectroscopie Raman est en cours de réalisation en collaboration avec M^r Arnaud Brioude.

- Une caractérisation physico-chimique des surfaces par FTIR à angle rasant est également en cours de réalisation en collaboration avec M^r Bernard Beaugiraud.

- Une étude biologique est envisagée au Laboratoire d'Interactions Cellules-MicroEnvironnement (LICME, INSERM UMR-S 926, IFR 53, Reims) en collaboration avec le Pr Dominique Laurent-Maquin.

4.3.2. Manipulations et article en cours d'élaboration

Le but de ce travail est double : d'une part tester l'efficacité de différents procédés de stérilisation, puis d'autre part d'évaluer les dégradations de surface en terme de qualité, de quantité, et de biocompatibilité. *Sine qua non*, les potentielles applications biomédicales seraient compromises en attendant de nouvelle voie de stérilisation à basse température ou température ambiante (Moisan et coll. 2001, Lakhssassi et coll. 2006).

Les substrats utilisés sont le Ti et le NiTi. Les FMP ont été déposés conformément aux précédentes études expérimentales réalisées durant ce doctorat. La couche précurseur à base de PEI a été supprimée en accord avec les résultats obtenus auparavant (Brunot et coll. 2007). De la même façon, les résultats précédents ont montré que 5 bicouches pouvaient être suffisant (Mahmudi et coll. 2006) car ce travail n'a pas pour but d'être comparé aux deux autres. Qui plus est, le nombre de bicouches n'a pas une importance majeure dans cette étude puisque le but ultime est d'analyser des FMP stérilisés *versus* non stérilisés. Les FMP se composent de PAH/PSS qui ont montré la meilleure réponse cellulaire envers des fibroblastes gingivaux humains (Brunot et coll. 2008).

Trois types de stérilisation ont été initialement choisies : la stérilisation par UV, la stérilisation par autoclave (AC), et la stérilisation à l'ETO. Un test qualitatif post-stérilisation a été réalisé par la méthode bactériologique des Bouillons de Schaedler. Les caractérisations physico-chimiques des surfaces sont étudiées par spectroscopie FTIR (incidence rasante de 6°), et par spectroscopie Raman. L'étude biologique avec des fibroblastes gingivaux humains est envisagée pour tester la cytocompatibilité des échantillons stérilisés *versus* non stérilisés.

Les premiers résultats concernant les 3 types de stérilisation testées qualitativement par bouillons de Schaedler (sur Ti) sont présentés dans le tableau 7.

Temps	N° Echantillons	Ti nettoyé	Ti + (PAH/PSS) ₅ Non Stérilisé	Ti + (PAH/PSS) ₅ + ETO	Ti + (PAH/PSS) ₅ + AC	Ti + (PAH/PSS) ₅ + UV
J4	1	-	+	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	+
	4	+	+	-	-	+
	5	-	+	+	-	+
	6	-	+	+	-	-
J7	1	+	+	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	+
	4	+	+	-	-	+
	5	-	+	+	-	+
	6	-	+	+	-	-
J21	1	+	+	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	+	+	-	-	+
	4	+	+	-	-	+
	5	-	+	+	-	+
	6	-	+	+	-	-

Tableau 7 : Stérilisations – 1^{ers} résultats des bouillons de Schaedler.
+ : prolifération bactérienne, - : absence de prolifération bactérienne.

Comme attendu, ces premiers résultats ont montré que l'autoclave était le seul procédé de stérilisation efficace parmi les trois procédés étudiés. Les stérilisations par UV et à l'ETO n'ont pas permis d'obtenir un état stérile de nos échantillons mais seulement une certaine *propreté*.

D'autre part, un des problèmes majeurs posé par l'ETO semblait provenir des molécules gazeuses qui ne parvenaient pas à diffuser au sein même du revêtement, bien que les échantillons aient été placés dans des boîtes à puits sans couvercle sous un double ensachage spécial afin de permettre les échanges gazeux. Un autre problème majeur de ce procédé de stérilisation reste les molécules d'ETO hautement toxiques qui, lorsqu'elles arrivent à pénétrer au sein même des films, peuvent rester emprisonnées dans le revêtement. La stérilisation à l'ETO a été évincée de notre protocole expérimental d'une part à cause de son

manque d'efficacité, et d'autre part à cause de l'effet toxique du gaz et de son potentiel relargage dans le temps.

Aux vues de ces premiers résultats, nous avons retenu comme seule et unique méthode de stérilisation l'autoclave (18 mins, 134°C) puisque ce procédé reste à ce jour la référence en terme de stérilisation des dispositifs médicaux et fait l'objet de recommandations légales selon l'AFNOR (annexe 2).

Les seconds résultats des bouillons de Schaedler après stérilisation par autoclave (sur Ti et NiTi) sont présentés dans le tableau 8 :

Temps	N° Echantillons	Ti + (PAH/PSS) ₅ Non Stérilisé	NiTi + (PAH/PSS) ₅ + Non Stérilisé	Ti + (PAH/PSS) ₅ + AC	NiTi + (PAH/PSS) ₅ + AC
J1	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	+	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
J2	1	+	-	-	-
	2	+	+	-	-
	3	-	-	-	-
	4	+	-	-	-
	5	-	+	-	-
	6	+	-	-	-
J5	1	+	-	-	-
	2	+	+	-	-
	3	-	-	-	-
	4	+	-	-	-
	5	-	+	-	-
	6	+	-	-	-

Tableau 8 : Stérilisation par autoclave – 2^{èmes} résultats des bouillons de Schaedler.
+ : prolifération bactérienne, - : absence de prolifération bactérienne.

La suite de notre travail propose d'étudier si les FMP pourraient résister à l'autoclave tout en gardant ses propriétés physico-chimiques face aux agressions thermiques nécessaires à ce procédé de stérilisation.

En ce qui concerne l'analyse des films par FTIR, les premières manipulations n'ont pas pu aboutir à des résultats scientifiquement exploitables (fig.14).

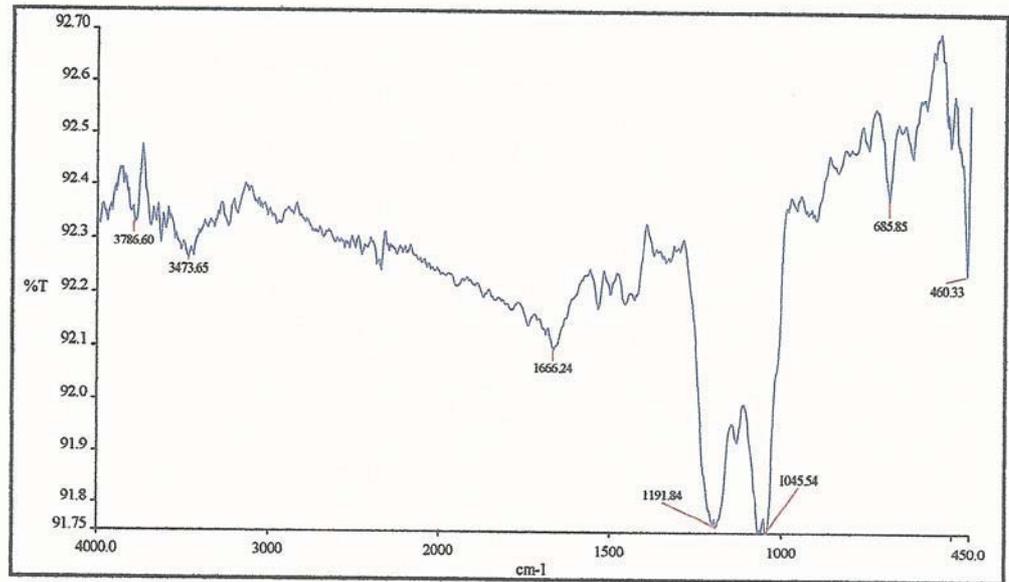


Figure 14 : Stérilisation par autoclave - Premiers résultats par spectroscopie FTIR.

En effet, l'angulateur de l'appareil ne permet pas l'analyse de films minces. Un angulateur à angle rasant avec une incidence de 6° est indispensable pour envisager l'analyse des FMP dont l'épaisseur est apparemment trop faible (échelle nanométrique). Les analyses sont en cours.

La rugosité de surface ne gêne à priori pas pour l'observation en Raman étant donné que l'épaisseur des films (PSS/PAH)₅ est de l'ordre de 50 nm (10 nm par bicouche). D'après les premiers résultats obtenus, aucune différence a été notée entre les échantillons stérilisés et non stérilisés. Deux solutions sont envisagées : soit l'épaisseur du film n'est pas assez importante, soit il n'y pas de modification de surface après une stérilisation par autoclave. *A priori*, ces premiers résultats nécessitent d'être confirmés avec une étude similaire mais avec des films plus épais (10 bicouches).

Pour compléter et étoffer notre recherche, nous envisageons d'étudier les substrats par spectroscopie photoélectronique (XPS) afin d'obtenir une analyse atomique de la composition chimique des surfaces.

En ce qui concerne la cytocompatibilité *in vitro*, les résultats initiaux n'ont pas pu être exploités en raison d'une trop faible viabilité des fibroblastes. Une nouvelle culture cellulaire de fibroblastes a été réalisée afin de refaire prochainement des essais.

5. Discussion générale

La construction de FMP sur Ti et alliage en NiTi offre des possibilités d'application clinique en implantologie dentaire, en orthodontie, ou encore en endodontie qui permettrait ainsi d'améliorer les thérapeutiques dentaires actuelles.

5.1. Optimisation des états de surfaces des biomatériaux métalliques

La rugosité de surface est un paramètre important pour les interactions biomatériau/cellules. Celle-ci influence considérablement la bio-intégration des matériaux dans l'écosystème buccal (Ponsonnet et coll. 2002, Feng et coll. 2003, Jain et Von Recum 2004, Chin et coll. 2007). Qui plus est, un traitement de surface physique de nos échantillons par polissage se justifiait par la nécessité d'avoir des états de surface reproductibles, homogènes, et identiques pour l'ensemble des recherches expérimentales *in vitro* réalisées durant ce doctorat (Brunot et coll. 2008). Dans nos travaux expérimentaux, la moyenne obtenue du coefficient de rugosité a été de $0,28 \mu\text{m}$ avec une petite différence entre le centre ($0,28 \mu\text{m}$) et le bord ($0,25 \mu\text{m}$). Ce coefficient de rugosité ($R_a=0,3\mu\text{m}$) a été choisi en cohérence avec les applications cliniques souhaitées et les résultats de la littérature sur des ostéoblastes (Lincks et coll. 1998, Castellani et coll. 1999, Guizzardi et coll. 2004, Wirth et coll. 2008) et des fibroblastes (Ponsonnet et coll. 2003, Jain et Von Recum 2004, Wirth et coll. 2004). Des études ont montré qu'une surface rugueuse favorisait la réponse cellulaire ostéoblastique (Feng et coll. 2003, Keller et coll. 2003, Tosatti et coll. 2003b, Jayaraman et coll. 2004, Albrektson 2008) alors qu'une surface lisse favorisait *a contrario* le comportement cellulaire fibroblastique (Mustafa et coll. 2001, Ponsonnet et coll. 2002).

Outre un traitement physique des surfaces, l'optimisation des états de surface peut également se réaliser par voie chimique. De nombreuses études ont démontré que des FMP pouvaient être physisorbés à la surface de certains biomatériaux dans le but de guider et/ou d'amplifier la réponse cellulaire (Picart et coll. 2001ab, Porte-Durieux et coll. 2001, Ai et coll. 2003). Le potentiel de surface du Ti et de ses alliages étant négatif, le pari de ce travail a été de démontrer que **des couches successives de polyélectrolytes anionique et cationique ont pu être déposées sur du TiCP et du NiTi en formant des FMP stables**, dont il reste en partie à vérifier la stabilité.

5.2. Caractéristiques requises des FMP en vue d'application médicale

D'après la littérature et les résultats obtenus dans nos recherches expérimentales, nous pouvons rassembler et énumérer les différentes caractéristiques requises des FMP au niveau physico-chimique, mécanique, et biologique en vue d'une application biomédicale (tabl.9). Ce cahier des charges résume toutes les propriétés requises des FMP mais n'ont pas toutes été étudiées dans notre travail. Ce cahier des charges évoque également les différentes voies de recherches envisageables pour un travail post-doctoral.

Caractéristiques requises des FMP en vue d'application biomédicale	
Caractéristiques physico-chimiques	Résistance à la corrosion Stabilité chimique Cohésion covalente Hydrophilie modérée Homogénéité de surface Rugosité de surface faible Stabilité thermique
Caractéristiques mécaniques	Adhérence au substrat Résistance à l'usure Résistance au cisaillement Elasticité Résistance à la stérilisation
Biocompatibilité	Absence de contamination Non cytotoxique Non toxique Non cancérigène Non thrombogène

Tableau 9 : Cahier des charges des FMP en vue d'application biomédicale. (les points étudiés dans ce travail sont notés en gras).

5.2.1. Caractéristiques physico-chimiques des FMP

L'épaisseur et la rugosité des films à base de PSS/PAH et HA/PLL sont différentes en raison de la nature des polyelectrolytes eux-mêmes (poids moléculaire et rigidité intrinsèque liée à la présence ou l'absence de charges aliphatiques) ainsi qu'aux liaisons entre les couches des différents polyelectrolytes utilisés. Les films à base de PSS/PAH contenant 10 bicouches ont une épaisseur

d'environ 50 nm alors que ceux à base de HA/PLL (contenant aussi 10 bicouches) présentent une épaisseur d'environ 1 μm (Picart et coll. 2001b, Lavallo et coll. 2002). Deux études ont montré que la rugosité des films à base de PSS/PAH était de 3,5 nm et que celle des films à base de HA/PLL, plus forte, était de 400 nm toujours pour 10 bicouches (Picart et coll. en 2001b, Lavallo et coll. en 2002). Les liaisons intra-moléculaires des chaînes et les forces d'interaction inter-moléculaires PSS-PAH en font des polyélectrolytes forts, et celles pour HA-PLL en font des polyélectrolytes faibles. D'après la littérature, la charge des films mesurée par potentiel zéta est pour PAH de + 85 mV, pour PSS de - 90 mV (Ladam et coll. en 2000, Bolto et Gregory 2007), et respectivement, de + 73 mV et - 88 mV pour PLL et HA selon Adamczyk et coll. (Adamczyk et coll. en 2007a). Pour les films réticulés, le potentiel pour HA est de - 50 mV et pour PLL de + 50 mV. **Ceci confirme que les terminaisons PSS et HA sont négatives, et PAH et PLL sont positives** (Picart et coll. 2001b). Cependant, la construction des FMP est hétérogène à cause de la rugosité initiale, comme nous le confirment les analyses en AFM et en microscopie confocale (figs.3 et 4 dans Brunot et coll. 2008). **Aussi, il n'est pas possible de déterminer si les terminaisons des dernières couches sont exclusivement positive ou exclusivement négative sur nos substrats.**

En microscopie confocale, nous constatons qu'il n'y a pas eu de dépôt de polyélectrolytes sur certaines zones et le film n'épouse pas la surface de l'échantillon de façon homogène (fig.4 dans Brunot et coll. 2008). Les entailles dues à la rugosité sont assez profondes et ne permettent pas une bonne pénétration des polyélectrolytes pendant le temps du dépôt de ces derniers. L'observation des images bidimensionnelles et tridimensionnelles en AFM (fig.3 dans Brunot et coll. 2007) montrent que les surfaces de tous les films sont moins rugueuses que la surface initiale. **La rugosité de surface est atténuée par le recouvrement des polyélectrolytes mais l'état de surface reste rugueux.** Le test de rugosité des films en AFM démontre une petite perte de rugosité (~ 80 nm) pour tous les types de films confondus. La pénétration des polyélectrolytes dans les rainures est hétérogène probablement à cause de leur composition chimique, de leur structure chimique (noyau polaire ou apolaire), et de l'encombrement stérique, de leurs chaînes ramifiées plus ou moins longues et plus ou moins

rigides. Les observations en microscopie confocale confirment ces propos pour les films à base de HA/PLL. Les fortes hystérèses des films PEI-(PSS/PAH)₁₀ et des échantillons témoins sans FMP, et les hystérèses plus faibles (mais différentes de 0°) pour les autres films renforcent les propos précédents et démontrent notamment la présence d'une hétérogénéité et mobilité des molécules chimiques et, accessoirement, une certaine rugosité de surface (figs.1 et 2 dans Brunot et coll. 2008). Cependant, les résultats statistiquement reproductibles obtenus en tensiométrie (angle à l'avancé, angle au retrait, et hystérèse de mouillage) permettent d'affirmer que la construction de chaque catégorie de films (fabrication robotisée ou manuelle) est similaire d'un échantillon à l'autre et d'une manipulation à l'autre (fig.1 dans Brunot et coll. 2008). **Les échantillons recouverts de FMP ont des surfaces chimiquement hétérogènes et physiquement rugueuses, accentuées par la rugosité initiale de la surface.**

L'analyse par tensiométrie permet de caractériser les propriétés physico-chimiques des surfaces en interprétant différents paramètres. La nature du liquide sonde utilisé joue un rôle important sur les mesures de l'angle de contact et peut être responsable du réarrangement de la structure chimique du biomatériau à son contact (Clam et coll. 2001, Adamczyk et coll. 2007a). Les variations de pH et de polarité entre les liquides sondes influencent directement le réarrangement des groupements chimiques des polyélectrolytes, en particulier par la diffusion/solubilisation du liquide à l'intérieur des couches (Adamczyk et coll. 2007a). De plus, les rainures de la rugosité initiale retiennent le liquide (Andrade 1983) ce qui contribue à l'existence d'une différence entre l'angle à l'avancé et celui au retrait dans l'eau. Rupp et coll. en 2002 montrent les effets de l'hétérogénéité de surface sur les mesures des angles de contact.

Les films PEI-(PSS/PAH)₁₀ et les films PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS sont peu hydrophiles mais les films à base HA/PLL sont tous les deux en revanche très fortement hydrophiles comme nous le montrent les résultats obtenus dans l'eau (fig.1 dans Brunot et coll. 2008). Aucun film n'est hydrophobe. Les résultats des angles de contact corroborent avec ceux d' Adamczyk et coll. obtenus récemment sur des films PSS/PAH (Adamczyk et coll. 2007a). L'état de surface semi-rugueux pour les témoins et l'hétérogénéité chimique des films peuvent

expliquer les résultats obtenus pour les hystérèses de mouillage (Andrade et coll. 1983, Vogler 1998, Chen et coll. 2001, Adamszyk et coll. 2007a). La structure et la nature de la terminaison chimique de chaque film influence la dynamique de l'hystérèse. L'absence de différence significative entre les différentes énergies de surface ($\sim 55 \text{ mJ/m}^2$) et les composantes dispersives ($50,8 \text{ mJ/m}^2$) pour tous les systèmes testés n'ont pas permis d'exploiter de potentielles différences dans les composantes acido-basique (fig.2 dans Brunot et coll. 2008). **Les fortes hystérèses des films (PSS/PAH)₁₀, ainsi que celles plus faibles pour les films à base de HA/PLL confirment les propos précédents avec la présence d'une certaine rugosité de surface et/ou un encombrement stérique important pour HA (fig.1 dans Brunot et coll. 2008).**

Le protocole de réticulation semble avoir été délicat dans notre travail malgré une préparation des produits à bonne concentration et fraîchement apprêtés à pH=5. **L'objectif d'optimiser les FMP à base de HA/PLL en les réticulant chimiquement n'a pas été atteint dans cette étude, malgré de très bons résultats obtenus récemment avec un procédé similaire** (Richert et coll. 2004, Schneider et coll. 2007). Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la rugosité initiale des biomatériaux métalliques est sans doute responsable de la mauvaise organisation des couches polyanioniques et polycationiques, et *de facto* de la mauvaise réticulation ultérieure des films à base HA/PLL. La nature intrinsèque et propre au Ti pourrait avoir aussi une explication à cette réticulation chimique insatisfaisante. Cependant, Werner et coll. en 2009 viennent de montrer que des FMP fonctionnalisés sur Ti et réticulés chimiquement par le même procédé amélioreraient la réponse cellulaire. Notons que cette réticulation chimique a été réalisé sur des FMP de composition différente, en l'occurrence du PLL/PGA (Werner et coll. 2009). La concentration des produits utilisés (NHS et EDC) pour la réticulation chimique pourrait aussi être concernée (Richert et coll. 2004). L'augmentation de ces concentrations serait intéressante à étudier ainsi que le comportement d'autre lignée cellulaire comme les ostéoblastes sur les films à base de HA/PLL réticulés.

5.2.2. Biocompatibilité des FMP

▪ Caractéristiques biologiques des FMP

Les images en MEB et les résultats du test MTT sur les témoins (figs.5 et 6 dans Brunot et coll. 2008) confirment les résultats trouvés dans la littérature en ce qui concerne la bonne biocompatibilité et biofonctionnalité du Ticp et du NiTi envers les fibroblastes (Richards 1996, Feng et coll. 2003, Jain et Von Recum 2003, Ponsonnet et coll. 2003, Jain et Von Recum 2004, Wirth et coll. 2004). L'orientation cellulaire (ostéoblastes et fibroblastes) après l'adhésion se fait en fonction du sens de rainures rugueuses (Ponsonnet et coll. 2002). D'autres études montrent aussi d'excellents résultats de cultures réalisées avec des ostéoblastes sur du Ticp avec des traitements de surface par sous-traction ou addition (Lauer et coll. 2001, Keller et coll. 2003, Guizzardi et coll. 2004, Jayaraman et coll. 2004). La rugosité des films et la présence sous-jacente de biomatériaux métalliques biocompatibles, favorisent l'adhésion cellulaire. Cependant, la nature des FMP semble être un élément fondamental pour la prolifération cellulaire puisque les films à base de PSS/PAH favorisent celle-ci *versus* les films à base de HA/PLL. **La nature du film est un paramètre important pour la prolifération cellulaire mais un facteur moins important pour l'adhésion.** Par conséquent, il n'y aurait pas de corrélation entre l'adhésion et la prolifération cellulaire en accord avec Mahmdi et coll. en 2006.

Pour des films de même nature, les résultats de la réponse cellulaire ainsi que les résultats des caractérisations physico-chimiques des surfaces sont superposables. En effet, les films PEI-(PSS/PAH)₁₀ et PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS sont similaires au niveau de l'adhésion et de leur prolifération qui sont toutes les deux favorables. Les films PEI-(HA/PLL)₁₀ et PEI-(HA/PLL)₁₀-HA, où les résultats sont également comparables, se distinguent des films à base de PSS/PAH par leur prolifération insuffisante après 7 jours de culture.

La fixation des cellules sur un substrat est assurée par un premier ancrage grâce aux protéines d'adhésion (fibronectine, vitronectine) (Reddi 1998) qui adaptent leur conformation tridimensionnelle selon la surface en présence (Hallab et coll. 2001, Lauer et coll. 2001, Pinzari et coll. 2002, Ponsonnet et coll. 2002). L'adsorption des protéines d'adhésion dépend de l'énergie de surface et de la

mouillabilité du substrat (Richards 1996, Keller et coll. 2003). La réorganisation de ces protéines est liée au mouillage de la surface du substrat provoquant une réponse des récepteurs cellulaires spécifiques. **L'adhésion des cellules a été satisfaisante pour des films hydrophiles comme des films à base de PSS/PAH ou des films beaucoup plus hydrophiles comme des films à base de HA/PLL.** Ces résultats corroborent ceux trouvés par Albrektson et coll. qui ont montré cliniquement qu'une surface hydrophile était meilleure en terme d'ostéo-intégration qu'une surface hydrophobe (Albrektson et coll. 2008).

L'adhésion cellulaire n'est donc pas exclusivement liée à l'hydrophilie de surface mais également à l'énergie de surface. L'énergie de surface influence l'adhésion cellulaire fibroblastique (Hallab et coll. en 2001). **L'ensemble des films, soit à base de PSS/PAH soit à base de HA/PLL, ont une énergie de surface voisine d'environ 55 mJ/m² et tous ces films permettent une adhésion des fibroblastes à J0.** Comme nous l'avons montré pour tous nos systèmes dans ce travail, il a été démontré qu'une énergie de surface supérieure à 50 mJ/m² favorisait l'adhésion cellulaire (Mahmudi et coll. 2006). **Par contre, l'effet de charge en surface n'apparaît pas être un paramètre majeur pour l'adhésion :** les cellules adhèrent aussi bien sur des surfaces à terminaisons négatives (terminaison PSS ou HA) que positives (terminaisons PAH ou PLL). Rappelons cependant que la construction des films est hétérogène, ce qui ne permet pas d'affirmer que la dernière couche est strictement positive ou négative. Ainsi, le Ti pourvu des différents types de FMP, à base de PSS/PAH ou à base de HA/PLL, permet l'adhésion des cellules fibroblastiques.

Richards en 1996, puis Wirth et coll. en 2008 ont montré que les fibroblastes proliféraient mieux sur des surfaces lisses que rugueuse. La rugosité conditionne le sens de prolifération et la conformation des cellules comme l'ont montré Eisenbarth et coll. en 1996. Une petite rugosité de surface peut entraîner un changement de forme et de position cellulaire sur la surface. De plus, la prolifération est modulée par l'hydrophilie de surface (Vogler 1998). **L'énergie de surface ne semble pas être un paramètre déterminant en rapport avec la prolifération cellulaire** (Mahmudi et coll. 2006). Nos résultats montrent que la

prolifération, pour une même énergie de surface, est différente pour les films à base de PSS/PAH et ceux à base de HA/PLL (fig.2 dans Brunot et coll. 2008).

L'effet de charge n'est pas directement corrélé à la prolifération cellulaire. Nous pouvons noter également que le groupement terminal anionique (comme PSS) ou cationique (comme PAH) n'est pas un paramètre qui influence la réponse cellulaire puisque les deux films PEI-(PSS/PAH)₁₀ et PEI-(PSS/PAH)₁₀-PSS avec des terminaisons de charges ioniques différentes entraînent le même comportement cellulaire pendant les 7 jours de culture (figs. 5 et 6 dans Brunot et coll. 2008). **C'est la nature chimique des polyélectrolytes, les atomes, et les noyaux constituants, la ramification des chaînes plus ou moins rigides qui importent plus que la charge terminale de la dernière couche** (Mahmdi et coll. 2006). De plus, la nature des films semble être déterminante pour un comportement cellulaire favorable à l'interface du biomatériau tant au niveau de la morphologie que de la prolifération cellulaire. En terme de prolifération cellulaire, les polyélectrolytes PSS et PAH semblent être des polyélectrolytes appréciés par les cellules fibroblastiques à l'opposé des polyélectrolytes HA et PLL, bien que réticulés. La cohérence des résultats du MEB et du test MTT appuie ces propos et permet d'affirmer qu'une très bonne adhésion cellulaire n'implique pas une bonne prolifération cellulaire comme les résultats l'indiquent au 7^{ème} jour de culture. **L'adhésion et la prolifération sont ainsi indépendantes l'une de l'autre, la prolifération dépendant de la nature intrinsèque du substrat et de la composition chimique des films qui le recouvrent.**

▪ **Cytotoxicité de la base précurseur des FMP à base de PEI**

Un des problèmes majeurs reste celui de la PEI qui est un polyélectrolyte synthétique décrit de façon ambiguë comme toxique (Tryohen-toth et coll. 2002, Moghimi et coll. 2005). Bolto et Gregory ont montré que les polyélectrolytes polycationiques sont plus toxiques que les polyélectrolytes polyanioniques (Bolto et Gregory 2007). Néanmoins peu d'études s'intéressent aux problèmes posés par l'utilisation de la PEI comme base précurseur des films et sa toxicité potentielle *in vitro* et *in vivo*.

La PEI interagit avec différents matériaux (verre, silicone, plastique, et Ti) par des liaisons inter-atomiques (liaisons faibles de Van der Waals et

d'hydrogène) et électrostatiques (Richert et coll. 2003, Adamczyk et coll. 2007b). Par conséquent, la PEI pourrait jouer un rôle majeur dans la construction des FMP sur Ti ou NiTi du fait de sa liaison forte et covalente, et participer ainsi au bon ancrage des autres bicouches déposées par dessus (Adamczyk et coll. 2007b). En effet, le Ti et le NiTi ont un potentiel de repos négatif ce qui permet à la PEI de s'adsorber physiquement (macromolécule chargée positivement). Toutefois, cette physisorption est totalement dépendante de la densité de charge que porte le polyélectrolyte (Lane et coll. 2008), du poids moléculaire (Morimoto et coll. 2003) et du pH (Mészáros et coll. 2004). Ainsi, plus le polyélectrolyte est chargé, plus le nombre de charges interagissant avec le biomatériau est important, et plus la physisorption est importante.

En 1986, Granger et coll. dans leur étude chez l'animal utilisaient les charges positives de la PEI pour évaluer le rôle des sites anioniques impliqués dans les échanges transvasculaires protéiques des cellules du mur intestinal de rats. Des résultats intéressants étaient obtenus par blocage de ces sites créant ainsi une augmentation du flux protéique de la lumière intestinale vers la circulation sanguine. Cependant, malgré ces bons résultats, les animaux ne pouvaient pas tolérer ces agents (Granger et coll. 1986). En 2005, Ai et coll. forment des micro/nanocapsules pour la délivrance de médicaments et/ou de gènes. Les parois de ces micelles sont constituées de PEI/PEG permettant leur fusion avec les parois cytoplasmiques mais pas *a contrario* avec les parois nucléaires. L'ajout du copolymère PEI-PEG augmente ainsi l'interaction des micelles avec les cellules cancéreuses après 24h d'incubation (Ai et coll. 2005). Plus récemment, de récents travaux *in vitro* semblent obtenir des résultats différents en ce qui concerne la toxicité de la PEI. Beyth et coll. en 2008 incorporent des nanoparticules de PEI dans une résine composite et celles-ci auraient un effet antimicrobien longue durée sur un large spectre de bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli*). Cependant, les auteurs prétendent qu'il n'y aurait pas d'effet mesuré sur la biocompatibilité sur une lignée cellulaire de type macrophage (Beyth et coll. 2008). Dong et coll. en 2008 montrent qu'un film de PEI/héparine permet d'augmenter la résistance à la corrosion et la biocompatibilité du NiTi vis à vis du sang de lapin (Dong et coll. 2008). Le degré

de cytotoxicité de la PEI serait ainsi dépendante de la lignée cellulaire comme nous l'avons déjà exprimé dans nos propos précédents (figs.1,2,3, et 4 dans Brunot et coll. 2007). En effet, nos résultats montraient une cytotoxicité plus importante pour les ostéoblastes que pour les fibroblastes. Cependant, rappelons que dans de récentes études, la PEI en solution aqueuse a été démontrée cytotoxique, même à faible concentration, en vers des ostéoblastes de lignée MG-63 et des fibroblastes gingivaux humains dans une étude sur les biomatériaux métalliques à base de Ti et de NiTi (Brunot et coll. 2007).

Tryoen-Toth et coll. avaient obtenus des résultats similaires de toxicité lorsque la PEI était en couche terminale sur des FMP (Tryoen-Toth et coll. 2002). La PEI incorporée en profondeur dans les couches n'est pas en contact direct avec les cellules et son caractère cytotoxique pourrait ne pas s'exprimer grâce à l'épaisseur du film. Les couches de polyélectrolytes recouvrent la première couche de PEI mais la dégradation mécanique (serrage de l'implant ou frottement d'un arc orthodontique par exemple) ou enzymatique (salive) des différentes multicouches dans le temps pourrait mettre en contact cette PEI avec les tissus de l'organisme (Bolto et Gregory 2007). Un procédé de stérilisation pourrait aussi dégrader physiquement et mécaniquement les couches superficielles des FMP, et mettre ainsi à nu la couche de PEI. Ainsi, il semble prudent de recommander que **la PEI utilisée fréquemment comme polyélectrolyte d'accroche doit être retirée en raison de son manque de cytocompatibilité.**

Afin de rendre les FMP biocompatibles au court et long terme, une des solutions envisagée est de construire ces films sans cette première couche de EPI à condition que la qualité de ces derniers ne soient pas entravée (Admaczyk et coll. 2007b). Il semble cependant plus intéressant de pouvoir trouver un autre polycation précurseur des FMP qui soit plus biocompatible tout en permettant l'accroche et la stabilisation du film au substrat. L'avantage serait d'allier ancrage et bioactivité de cette dernière. Cai et coll. en 2008 ont proposé des surfaces de Ti fonctionnalisés avec des FMP à base de chitosane et ont étudié le comportement cellulaire avec des ostéoblastes. Les résultats montrent que des films PEI-(PSS/Chi) peuvent se construire sur du Ti tout en améliorant la réponse ostéoblastique, ce qui représente des perspectives très intéressantes. Une base d'aminopropylsilane pourrait être considérée avec ses avantages d'auto-

assemblage aisé, de la présence d'une liaison peptidique amphiphile et covalente, et d'une bioactivité avérée (Sargeant et coll. 2008). Une autre voie pourrait être également envisagée en utilisant du chitosane comme base précurseur sur le Ti ou le NiTi avec un avantage réel quant à ses propriétés antibactériennes (Fu et coll. 2005, Channasanon et coll. 2007). De plus, le chitosane paraît être une base d'avenir puisque cette molécule associée à un facteur de croissance osseux (RGD) optimise la réponse ostéoblastique sur du Ti et par conséquent pourrait favoriser l'ostéo-intégration des implants dentaires endobuccaux (Cai et coll. 2008, Chua et coll. 2008). Les propriétés mécaniques, la dégradation, et la croissance osseuse dépendraient du degré d'acétylation du chitosane (Yuan et coll. 2008) et d'autres études seraient à conduire.

5.2.3. Comportement des surfaces face à un procédé de stérilisation

Comme décrit précédemment, les revêtements par FMP pourraient optimiser les états de surface du Ti et de ses alliages à base de Ni (Brunot et coll. 2008, Cai et coll. 2008, Soumetz et coll. 2008) en permettant l'intégration de nombreuses molécules entre les couches polyélectrolytique. L'assemblage des FMP a pour intérêt majeur de se réaliser à basse température permettant de pouvoir conserver les propriétés et la bioactivité des molécules d'intérêt insérées.

Un des problèmes majeur reste les contraintes de stérilisation des dispositifs médicaux en vue d'une application biomédicale (AFNOR).

▪ Influence des procédés de stérilisation sur les biomatériaux métalliques

Les recherches concernant l'influence d'une stérilisation sur les propriétés physico-chimiques des alliages en NiTi mettent en évidence que les matériaux métalliques subissent de nombreuses modifications de surface (Jordan et coll. 1997). En effet, certaines méthodes de stérilisation modifient de façon importante la mouillabilité du matériau. A titre d'exemple, la décontamination à l'acide peracétique, la stérilisation à l'ETO, ou encore la stérilisation à la chaleur sèche rendent la surface plus hydrophile alors que la stérilisation par autoclave la rend moins hydrophile, l'angle de contact variant de 40° à 90° (Thierry et coll. 2000a).

Une augmentation de la rugosité de surface a été également décrite après une stérilisation par chaleur sèche (Thierry et coll. 2000b).

D'autre part, la stérilisation par autoclave peut modifier les propriétés physiques des surfaces (Thierry et coll. 2000, Jones et coll. 2001), et peut entraîner des modifications structurales et mécaniques du matériau (Dubois et coll. 2001). Plus récemment, des études ont permis de montrer qu'une stérilisation par autoclave modifiait les propriétés de surface d'instruments endodontiques en NiTi (Alexandrou et coll. 2006, Valois et coll. 2008). Cependant, d'autres études ont mis en évidence que la stérilisation par autoclave n'avait pas d'influence significative sur la dureté, la rugosité et le coefficient de friction d'arcs orthodontiques (Pernier et coll. 2005, Grosogeat et coll. 2006). D'autres auteurs ont également étudié l'influence des cycles répétés de stérilisation par autoclave sur des plaques d'ostéosynthèse en Ti. Ceux-ci ne porteraient pas atteinte aux propriétés mécaniques du biomatériau (Collela et coll. 2008) bien que d'autres auteurs ont démontré récemment l'inverse sur des instruments endodontiques en NiTi. En effet, Viana et coll. 2006 montrent que les procédures de stérilisation n'entraînent pas de changements importants au niveau de la dureté de Vickers, ni au niveau de la résistance mécanique de fils orthodontiques en NiTi. Toutefois, **un nombre élevé de cycles de stérilisation à l'autoclave (> 5 cycles) entraîne des modifications mécaniques de l'alliage** (Viana et coll. 2006).

En outre, l'influence d'un procédé de stérilisation sur les propriétés chimiques a été mise en évidence par plusieurs auteurs. Par exemple, les processus de stérilisation modifient l'homogénéité et la composition de la couche de passivation des alliages en NiTi. Ainsi, les stérilisations par autoclave ou par ETO engendrent une réorganisation importante de la couche de TiO_2 qui se traduit par une inhomogénéité de son épaisseur et une augmentation du taux de Ni en surface. La chaleur sèche ou l'acide peracétique provoquent une diffusion des ions Ni et Ti vers la surface tandis que la stérilisation par gaz plasma ne provoque *a priori* aucune modification de surface (Thierry et coll. 2000a, Youngblood et Ong 2003). Ces modifications se traduisent notamment par une altération de la résistance à la corrosion du Ti et du NiTi (Kuphasuk et coll. 2001, Essouni et coll. 2002, Rocher et coll. 2004, Huang et coll. 2005), en particulier pour les métaux et alliages stérilisés par autoclave (Thierry et coll. 2000ab). De plus, l'analyse

récente de limes endodontiques soumises au protocole de décontamination au moyen d'hypochlorite de sodium a révélé une corrosion très importante des instruments (Sonntag et Peters 2007). Il est toutefois intéressant de constater que l'électro-polissage préalable d'échantillons en NiTi évite les risques de modifications de résistance à la corrosion induite par la stérilisation (Thierry et coll. 2000a/2000b).

Enfin, une stérilisation porte préjudice aux propriétés biologiques des biomatériaux car ces procédés augmentent la rugosité des surfaces. Le coefficient de rugosité est très augmentée lorsque le matériau subit une stérilisation par rayons γ mais reste stable lorsque la stérilisation est réalisée par autoclave (Bertrand et coll. 2005). Une autre étude montre que même après un nettoyage aux ultrasons et une stérilisation par autoclave, de nombreux débris peuvent rester sur des instruments endodontiques en NiTi (Parirokh et coll. 2005). Les procédés de stérilisation auraient ainsi une influence sur le coefficient de rugosité entraînant une adhésion bactérienne plus importante avec la présence d'un biofilm salivaire lui aussi plus important sur des implants en Ti (Chin et coll. 2007).

Enfin, les effets potentiels d'une élévation de température sur l'intégrité des revêtements de polyélectrolytes doivent être étudiés. Les méthodes de stérilisation à haute température, comme l'autoclave à 134°C, sont effectivement déconseillés pour le traitement et la stérilisation des matériaux thermosensibles.

De nombreux auteurs tentent de revêtir les surfaces par de nouveaux traitements de surface afin d'améliorer la résistance à la corrosion des biomatériaux métalliques (Cheng et coll. 2004, Poon et coll. 2006, Bilhan et coll. 2007, Yeung et coll. 2007). Les FMP pourraient faire parti de ces revêtements garantissant une certaine résistance à la corrosion, qui plus est en les rendant bioactifs.

▪ Influence des procédés de stérilisation sur les FMP

La bibliographie est peu exhaustive à ce propos. Les polyélectrolytes supportent difficilement les élévations de température (134°) qui modifient les chaînes intra et inter-moléculaires et la topographie tridimensionnelle. De plus, le cycle de stérilisation doit être de 18 mins pour espérer inactiver les prions et cette durée pourrait aussi exposer les polyélectrolytes (PSS/PAH) à des modifications

chimiques, physiques et biologiques des surfaces (Köhler et coll. 2007, Brétagnol et coll. 2008). Le problème majeur reste la répétition des cycles de stérilisations (Colella et coll. 2008, Kanjickal et coll. 2008) dans le domaine Odontologique : les polyélectrolytes ne devraient pas résister à ces contraintes et l'obligation, par exemple de se diriger vers une instrumentation endodontique à usage unique s'imposerait. Les FMP pourraient être par conséquent modifiés au niveau de nombreux paramètres (chimique, physique, mécanique, et biologique). Kanjickal et coll. ont montré que la stérilisation par rayonnement γ dégradait plus des hydrogels à base de polyéthylène glycol que la stérilisation par l'ETO (Kanjickal et coll. 2008). En l'état des connaissances actuelles, aucune référence bibliographique traite de l'influence d'un procédé de stérilisation par autoclave sur les polyélectrolytes.

5.3. Bioactivité des FMP et perspectives biomédicales en Odontologie

L'insertion de protéines ou de peptides interagissant avec les récepteurs cellulaires constitue une voie intéressante de fonctionnalisation.

La conception de surfaces biomimétiques pour les biomatériaux métalliques (Ti et NiTi) envers les ostéoblastes est prometteuse (Pasqui et coll. 2007, Hélyary et coll. 2008, Mayingi et coll. 2008). L'intégration de facteur de croissance pourrait réguler les comportements cellulaires de prolifération, de différenciation ou d'expression protéique (Kapanen et coll. 2002). Des particules de phosphate de calcium pourraient précipiter la formation de cristaux d'apatite rendant le biomatériau ostéoconducteur (Schaaf et coll. 2002). L'intégration de protéines d'adhésion type fibronectine ou vitronectine, de facteurs de croissance osseux (type TGF, Chi) favorisant la réponse cellulaire au niveau des tissus conjonctif et osseux dans l'écosystème buccal, est un objectif essentiel dans cette ingénierie tissulaire. Les implants dentaires en Ti sont biocompatibles mais pourraient devenir bioactifs en améliorant la bio-intégration tout en minimisant le temps de cicatrisation des tissus péri-implantaires (muqueux et osseux) pour les rendre fonctionnels plus rapidement chez les patients (Brunot et coll. 2008, Cai et coll. 2008, Wever et coll. 2009). Muller et coll. en 2008 ont montré qu'un facteur de croissance (TGF) pouvait être introduit dans des FMP à base de PSS/PAH fonctionnalisés sur du Ti. Soumetz et coll. réalisent récemment des surfaces biomimétiques sur du NiTi en incorporant dans les FMP de la fibronectine

(glycoprotéine d'adhésion de la MEC) qu'ils testent vis à vis d'ostéoblastes de la lignée MG-63. Les résultats prouvent l'efficacité de ces surfaces biomimétiques et bioactives (Soumetz et coll. 2008).

De même, des revêtements HA/Chi à la surface de stents endovasculaires en NiTi permettraient de diminuer l'adhésion plaquettaire de 40% et augmenter ainsi la thromborésistance de ces dispositifs (Thierry et coll. 2003). Une autre étude menée dans des conditions mimant celles de l'environnement buccal a montré une dégradation rapide du film sous l'effet d'enzyme salivaire. La réticulation de ces films grâce à un carbodiimide et un catalyseur de type ester a permis de diminuer la dégradation de ces films en présence de salive (Picart et coll. 2005). L'incorporation de peptides spécifiques de l'adhésion d'une espèce cellulaire pourrait également guider la bio-intégration d'un dispositif pourvu de FMP. L'activité anti-inflammatoire des films PLL/PGA (dans lesquels ont été insérés des molécules de pyroxicam ou de laminine) a été mise en évidence dans une étude menée par Voegel et coll. en 2003 et par Werner et coll. en 2009. Une autre étude montre que des FMP à base de PSS/PAH microcapsulés et revêtue d'une couche de PEG (PLL-g-PEG), représentent un système prometteur pour une délivrance de médicaments (Wattendorf et coll. 2008). Borodina et coll. décrivent que des microcapsules à base d'alginate et de PLL permettent de piéger une enzyme (la chymotrypsine) tout en conservant sa bioactivité après son relargage (Borodina et coll. 2007b). Ladhari et coll. en 2008 fonctionnalisent des surfaces en silicone avec des FMP organique (PSS) et des nanoparticules inorganiques de TiO₂ qui permettent de changer les propriétés de surface du FMP.

D'autres résultats ont été récemment obtenu sur des membranes composite fonctionnalisées par des FMP à base de Chi/PLL. Le but est d'augmenter le potentiel de régénération osseuse. En effet, ces FMP amélioreraient la cytocompatibilité des surfaces envers des ostéoblastes comparativement à du chitosane seul (Zheng et coll. 2008). Enfin, Zhou et coll. montrent en 2007 que la modification chimique de surfaces implantaires en Ti grâce à un polymère bioactif tel que le PSS permet de diminuer sensiblement l'adhérence des *Staphylococcus aureus*. Le but est d'obtenir des surfaces dotées de propriétés inhibitrices de l'adhérence bactérienne pathogénique comme *Porphyromonas gingivalis* (PG) de la flore buccale afin de limiter les infections

péri-implantaires. Ces infections représentent l'une des causes majeures d'échec de l'ostéo-intégration des implants dentaires. L'adhérence bactérienne sur l'implant dépend des propriétés physico-chimiques et topographiques de la surface. Ces surfaces de Ti greffées présentent un intérêt évident en terme d'application clinique dentaire pour le revêtement de surface des implants (Zhou et coll. 2007). L'effet antibactérien pourrait être augmenté par l'insertion de chlorhexidine ou de fluorures au sein même des couches si ce greffage pouvait être techniquement possible (Chin et coll. 2007). **L'idéal serait que ces propriétés antibactériennes puissent être étendues à tous les dispositifs biomédicaux à base de Ti et d'alliage de Ti, et spécifiquement dans notre domaine dentaire pour les implants, les fils orthodontiques, et les limes endodontiques.**

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES POST-DOCTORALES

« Toute science est une connaissance certaine et évidente ».

René Descartes (1596-1650)

Notre thématique de recherche sur les FMP reste très actuelle comme nous le démontre le rapport du 7th *International Symposium on Polyelectrolytes* qui s'est tenu en juin 2008 à l'Université de Combria au Portugal (Piculell et Santore 2008).

Cette voie de recherche semble très intéressante pour les Odontologistes en terme d'ingénierie tissulaire. Les biomatériaux métalliques revêtus de FMP sont une voie prometteuse de fonctionnalisation des dispositifs médicaux, notamment en rendant les surfaces bioactives. Les différentes recherches menées tout au long de cette thèse nous permettent de conclure que les films à base de PSS/PAH engendrent une meilleure réponse cellulaire que les films à base de HA/PLL sur le Ti. Les couches terminales PSS et PAH influencent favorablement la réponse cellulaire sans distinction notable : ces deux polyélectrolytes permettent l'adhésion et la prolifération de fibroblastes.

D'autre part, nous avons montré que la PEI était potentiellement cytotoxique et insuffisamment biocompatible *in vitro* sur deux lignées cellulaires endobuccales (fibroblastes et ostéoblastes), que ce soit sur du Ti ou du NiTi. Les biomatériaux fonctionnalisés par des FMP contenant de la PEI soulèvent un problème majeur pour la bio-intégration *in vivo* et pour le futur potentiel des applications cliniques. Il en résulte que tous les FMP devraient être construits sans couche précurseur à base de PEI, ou avec une tout autre base moléculaire plus biocompatible.

Une stérilisation par autoclave est efficace sur les FMP. Le souci majeur reste de vérifier que les films ne sont pas dégradés/détruits et qu'ils conservent toutes leurs propriétés physiques, chimiques, et biologiques après un cycle de stérilisation à 134°C pendant 18 mins, ainsi que le substrat lui-même. Une stérilisation à froid au gaz plasma semble avoir un avenir meilleur pour les FMP qui ne seraient alors plus sollicités par de hautes températures lors du procédé de stérilisation. Il est également important de souligner que ces revêtements devront être suffisamment résistants aux perpétuelles agressions qui se produisent dans la cavité buccale : variations thermique (alimentation), cycles masticatoires répétitifs, variations de pH (acidité alimentaire), soins fluorés prophylactiques, et micro-organismes endo-buccaux (flore buccale et salive).

Les perspectives de recherches sur les FMP sont très vastes. L'inclusion de molécules d'intérêts au sein même des couches reste la perspective la plus intéressante pour l'amélioration et l'optimisation de la bio-intégration. Beaucoup d'auteurs travaillent déjà sur cette thématique. De notre côté, il nous semble intéressant d'approfondir nos recherches sur les points suivants :

- Une modification de la rugosité de surface serait intéressante à étudier en reprenant les mêmes protocoles expérimentaux : une surface en titane polie miroir totalement lisse *versus* une surface encore plus rugueuse ($R_a=3\mu\text{m}$) se rapprochant cliniquement d'un état de surface d'implant.
- Le vieillissement des films à long terme et/ou leur comportement vis à vis d'une flore bactérienne, d'une salive endo-buccale, d'une variation de pH, ou encore d'une variation de température endo-buccale pouvant aller jusqu'à 40 degrés°C.
- La résistance à l'usure des films retient tout particulièrement notre attention. En effet, le serrage mécanique de l'implant dans l'os (compression), le frottement d'un boîtier orthodontique en bouche (lubrifiant), ou encore le travail d'un instrument endodontique dans des canaux dentaires (torsion) pourrait arracher le film ou du moins quelques couches polyélectrolytiques.

Dans un dernier temps, aux vues des résultats complémentaires, l'expérimentation animale *in vivo* restera l'étape incontournable de ce travail. Ces perspectives étayent un projet post-doctoral.

DOCUMENT DE SYNTHÈSE

▪ Contexte du travail

Les progrès scientifiques et cliniques en Odontologie ont permis ces dix dernières années de remplacer des dents absentes dans l'écosystème buccal grâce à des systèmes de racine artificielle, appelés implants dentaires. Le titane reste le biomatériau de référence pour ce type de traitement prothétique grâce à ses propriétés physico-chimiques, mécaniques et biologiques très satisfaisantes (biocompatibilité, biofonctionnalité et biosécurité). L'alliage en NiTi trouve quant à lui d'autre application en Odontologie, tout particulièrement en orthodontie et en endodontie.

La littérature décrit la complexité des différents problèmes rencontrés lors de la mise en place clinique de tels artifices thérapeutiques. En effet, la notion d'interface et l'étude des états de surface pour les biomatériaux implantables sont fondamentales en Odontologie. Des traitements de surface permettent de modifier les propriétés physico-chimiques de ces biomatériaux afin d'améliorer la réponse cellulaire et d'optimiser leur bio-intégration en terme de qualité et de temps.

D'autres voies de recherche s'ouvrent aujourd'hui, notamment en recouvrant les surfaces avec des produits biologiques bioactifs (peptides, collagène, protéines d'adhésion). La multiplication des études *in situ* ont largement prouvé que des polyélectrolytes pouvaient recouvrir certains matériaux comme le verre ou le plastique sous forme de films multicouches (Decher 1997).

Les films multicouches de polyélectrolytes apparaissent une voie originale de modification biologique des surfaces mais soulèvent en contre partie de nombreuses questions en vue d'une application biomédicale, et tout particulièrement en Odontologie. Différents éléments sont à étudier avant de pouvoir envisager *in vivo* une application avec de tels revêtements, notamment en ce qui concerne leur biocompatibilité et leur comportement face à des procédés de stérilisations.

▪ **Direction des recherches et collaborations inter-laboratoire**

La direction des recherches est menée par le Docteur Brigitte Grosogeat (MCU-PH en Odontologie) au Laboratoire des Multimatériaux et des Interfaces (LMI, Equipe Biomateriaux et Interfaces Biologiques, Université Claude Bernard Lyon1, UMR-CNRS 5615, Lyon) en collaboration avec le Professeur Laurence Mora-Ponsonnet du Laboratoire de Bio-Ingénierie de Polymères Cardiovasculaires (LBPC, INSERM U698, Bureau E119, Institut Galilée, Université Paris 13). Le Laboratoire d'Etude des Interfaces et des Biofilms où ces recherches doctorales avaient débuté (LEIBO, Faculté d'Odontologie, Université Claude Bernard Lyon1, EA 637, Lyon) a été rattaché depuis janvier 2007 au LMI.

D'autre part, nous avons eu l'occasion de collaborer avec le Professeur Catherine Picart à l'Ecole Européenne de Chimie, Polymères, et Matériaux (ECPM, Inserm U595, Faculté de Médecine, Strasbourg) en 2004, et avec Mr Bernard Beaugiraud au Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes (LTDS, UMR-CNRS 5513, Ecole Centrale, Lyon).

La spécificité et la complémentarité de ces différents laboratoires ont permis une meilleure approche des travaux de recherches et soulignent la complexité des phénomènes rencontrés aux interfaces des biomatériaux en contact avec les tissus humains.

▪ **Synthèse de la recherche expérimentale**

1) *Première étude expérimentale : Etude et optimisation de films multicouches de polyélectrolytes sur titane*

Le but de ce travail était de modifier l'état de surface du titane en déposant des films multicouches de polyélectrolytes. L'objectif était double : d'une part nous cherchions à montrer que des films de polyélectrolytes pouvaient effectivement se déposer sur le titane, et d'autre part à étudier *in vitro* le comportement cellulaire de fibroblastes humains sur ce genre de films. Des films de polyélectrolytes à base de PAS/PAH (non réticulés chimiquement) et HA/PLL (réticulés chimiquement) ont été construits avec une première couche de base de PEI (polyéthylèneimine). La caractérisation physico-chimique des surfaces a été réalisée par tensiométrie, microscopie à force atomique et microscopie confocale. L'étude biologique avec des fibroblastes humains a été menée sur 7 jours (J0, J2, J4 et J7) pour observer

la réponse cellulaire grâce à la microscopie électronique à balayage (MEB) et au test de Mosmann.

Nous avons montré dans ce travail qu'une modification de surface par dépôts successifs de polyélectrolytes peut se réaliser sur un biomatériau métallique comme le titane. La présence d'une rugosité de surface ne permet pas une bonne pénétration des polyélectrolytes dans les creux. Cette rugosité initiale, bien que très faible, est sans doute responsable de la mauvaise organisation des couches polyanioniques et polycationiques mais également de la réticulation insatisfaisante ultérieure des films à base HA/PLL. Tous les films permettent une adhésion cellulaire dans les premières heures de culture mais en terme de prolifération, les films à base de PSS/PAH restent très favorables pour les fibroblastes alors que les films à base de HA/PLL réticulés ne permettent pas aux cellules de proliférer normalement. Ainsi, l'adhésion cellulaire ne serait pas directement liée à l'hydrophilie de surface mais à la composition chimique au sein même du biomatériau et à l'énergie de surface. Il a été prouvé qu'une énergie de surface supérieure à 50 mJ/m^2 favorisait l'adhésion cellulaire comme nous l'avons démontré pour tous nos systèmes dans ce travail. La nature du film est un élément important pour la prolifération mais un élément moins important pour l'adhésion cellulaire. L'adhésion et la prolifération sont ainsi indépendantes l'une de l'autre, la prolifération dépendant de la nature intrinsèque du substrat, de la composition chimique, et de la topographie du film. La prolifération est modulée par l'hydrophilie de surface : les fibroblastes prolifèrent mieux sur des surfaces moyennement hydrophiles. Pour conclure, les résultats montrent que les films à base de PSS/PAH engendrent une meilleure réponse cellulaire que les films à base de HA/PLL réticulés. Les couches terminales PSS et PAH influencent favorablement la réponse cellulaire sans distinction notable : ces deux polyélectrolytes permettent l'adhésion et la prolifération de fibroblastes.

Cette étude a fait l'objet d'un article international intitulé « Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium » dans la revue Dental Materials (IF : 2,99 ; Dent Mater 2008,24(8):1025-35).

2) Deuxième étude expérimentale : Toxicité de la base précurseur des films multicouches de polyélectrolytes, la Polyéthylèneimine (PEI)

L'application clinique de ce type de revêtement à base de polyélectrolytes nous a conduit à mener une étude approfondie sur la base précurseur de PEI. La PEI est un polymère synthétique très largement utilisé dans deux nombreux domaines mais les propriétés biologiques et la biocompatibilité de cette macromolécule cationique sont assez ambiguës. Une multitude de travaux fondés sur les biomatériaux recouverts de films multicouches de polyélectrolytes sont construits avec de la PEI en couche précurseur. La littérature décrit pourtant une certaine forme de toxicité de ce polymère envers plusieurs lignées cellulaires (Moghimi et coll. 2005, Tryoen-toth et coll. 2002).

L'étude a été menée sur du titane et du nickel-titane. La biocompatibilité de la PEI *in vitro* a été testé avec deux types de lignées cellulaires humaines. Une couche de PEI a été déposée à la surface des échantillons. Après adsorption, une étude biologique a été classiquement réalisée sur 7 jours grâce à du MEB et un test de Mosmann. Deux types de lignées cellulaires ont été testés : des fibroblastes gingivaux humains et des ostéoblastes de la lignée MG-63. Les résultats ont révélés que la couche de PEI génèrait une réponse cellulaire défavorable avec une absence de croissance des fibroblastes et des ostéoblastes humains après 7 jours de culture. Nous avons ainsi démontré que la PEI était potentiellement cytotoxique et insuffisamment cytocompatible *in vitro*. En conséquence, les biomatériaux recouverts de films de polyélectrolytes contenant de la PEI soulève un problème majeur sur la bio-intégration *in vivo* et sur le futur potentiel des applications cliniques en Odontologie et en Médecine. Il en découle que tous les films multicouches de polyélectrolytes devraient être construits sans couche précurseur à base de PEI, ou avec une autre base moléculaire plus biocompatible que celle-ci.

Cette étude a fait l'objet d'une publication internationale intitulée « Cytotoxicity of Poly-ethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films » dans la revue Biomaterials (IF : 6,662 ; Biomaterials 2007,28(4):632-40).

3) Troisième étude expérimentale : Stérilisation des films multicouches de polyélectrolytes

Pour poursuivre dans la recherche d'une application biomédicale, il était indispensable d'étudier l'influence d'une stérilisation efficace et conforme aux normes en vigueur pour les dispositifs biomédicaux.

L'étude est menée avec des échantillons en titane commercialement pur et en alliage nickel-titane. Ces biomatériaux sont classiquement recouverts par nos films. Trois types de stérilisation sont testés : l'Ultra-Violet (UV), l'autoclave et l'oxyde d'éthylène (ETO). Cette étude a pour objectif d'analyser plusieurs paramètres et s'organise en trois parties :

➤ Vérification des méthodes intrinsèques de stérilisation

L'efficacité de la stérilisation a été contrôlée au niveau bactériologique grâce au Bouillon de Schaedler. Le but était d'estimer le niveau de contamination de nos échantillons pour chacune des méthodes de stérilisation. Les premiers résultats ont montré que l'autoclave était le seul moyen de stérilisation fiable et incontestablement efficace.

➤ Vérification de la qualité physico-chimique des films après stérilisation

Une caractérisation physico-chimique des surfaces est envisagée afin de s'assurer que les FMP restent parfaitement intacts après la stérilisation.

➤ Etude biologique

L'objectif est de tester *in vitro* la réponse biologique du biomatériau stérilisé avec des fibroblastes et des ostéoblastes humains.

Pour conclure, les manipulations expérimentales sont en cours et les résultats déjà obtenus sont encourageants mais n'ont pas permis d'être exploités à ce jour. Nous souhaitons clore ce travail sous forme d'une troisième publication internationale.

▪ Conclusion et perspectives de travail post-doctoral

Les films multicouches de polyélectrolytes n'ont plus à prouver tout leur intérêt pour les Odontologues en terme d'ingénierie tissulaire. La perspective d'une application clinique nécessite encore de mener des études approfondies sur

différents paramètres tels que la **résistance à l'usure** (perte de matière) et au **frottement** (perte et/ou déplacement de matière) (Sato 2005, Di Fiore 2007, Alves-Claro et coll. 2008), le **vieillissement** et la **dégradation** des films à long terme, leur comportement **en milieu salivaire et/ou fluoré** (Huang et coll. 2002, Schiff et coll. 2004), leur résistance aux **variations de pH**, aux ultra-sons (Parirokh et coll. 2005), et leur **résistance à la chaleur corporelle de 37°** (Sabot et Krause 2002, Köhler et coll. 2007). Les travaux effectués tout au long de ce doctorat et les résultats obtenus motivent à développer cette thématique en conduisant d'autres recherches dans les années à venir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Nota Bene aux lecteurs :

Les références bibliographiques des articles internationaux publiés dans cette thèse ne sont pas repris systématiquement ci-dessous afin d'éviter toute redondance (cf. III. Recherches expérimentales, 4. Résultats et discussion).

1. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A and Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics : an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002,29(5):448-55.
2. Ai H, Jones S, Lvov Y. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes and nanoparticles. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2003,39:23-43.
3. Ai H, Meng H, Ichinose I, Jones S, Mills D, Lvov Y, Qiao X. Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *J Neurosci Methods* 2003,128:1-8.
4. Ai H, Pink JJ, Shuai X, Boothman DA, Gao J. Interactions between self-assembled polyelectrolyte shells and tumor cells. *J Biomed Mater Res A* 2005,73(3):303-12.
5. Adamczyk Z, Zembala M, Kolasinska M, Warszynski P. Characterization of polyelectrolyte multilayers on mica and oxidized titanium by streaming potential and wetting angle measurements. *Colloid Surf A – Physicochem Eng Aspects* 2007,302(1-3):455-60.
6. Adamczyk Z, Michna A, Szaraniec M, Bratek A, Barbasz J. Characterization of poly(ethylene imine) layers on mica by the streaming potential and particle deposition methods. *Journal Colloid Interface Science* 2007,313(1):86-96.
7. Albrektson T. Signification clinique et expérimentale de l'ostéo-intégration. Une actualisation des critères de succès et d'évaluation longitudinale. *J Parodontol* 1991,10(2):115-30.
8. Albrektson T. Hard tissue implant interface. *Dent J* 2008,53,(1):S34-8. Review.
9. Alexandrou GB, Chrissafis K, Vasiliadis LP, Pavlidou E, Polychroniadis EK. SEM observations and differential scanning calorimetric studies of a new and sterilized nickel-titanium rotary endodontic instruments. *J Endod* 2006,32:675-9.
10. Alexandrou G, Chrissafis K, Vasiliadis L, Pavlidou E, Polychroniadis EK. Effect of heat sterilization on surface characteristics and microstructure of Mani NRT rotary nickel-titanium instruments. *Int Endod J* 2006,39(10):770-8.
11. Alves-Claro AP, Claro FA, Uzumaki ET. Wear resistance of nickel-titanium endodontic files after surface treatment. *J Mater Sci Mater Med* 2008,19(10):3273-7.
12. Andrade J, Smith LM, Gregonis DE. The contact angle and interface energetics, surface and interfacial aspects of biomedical polymers. Plenum Press, New-York and London 1983,(1):249-89.
13. Antunes FE, Marques EF, Gomes R, Thuresson K, Lindman B, Miguel MG. Network formation of cationic vesicles and oppositely charged polyelectrolytes. Effect of polymer charge density and hydrophobic modification. *Langmuir* 2004,20(11):4647-56.
14. Baigl D. Etude expérimentale de polyélectrolytes hydrophobes modèles. Thèse d'Université, Université Paris VI, 2003.
15. Beringer JP, Orme CA, Gilbert JL. In situ imaging and impedance measurements of titanium surfaces using AFM and SPIS. *Biomaterials* 2003,24:1837-52.
16. Bercy P, Tenenbaum H. Parodontologie : Du diagnostic à la pratique. Ed. De Boek & Larcier s.a. 1996, Département De Boek Université. Paris, Bruxelles.

17. Bertrand AL, Morrier JJ, Benay G, Ponsonnet L, Barsotti O. Effect of various hygienic treatment of orthodontic alloys on *in vitro* mutans streptococci adherence. *Eur Cells Mater* 2005,9:39-40.
18. Beyth N, Hourri-Haddad Y, Baraness-Hadar L, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI. Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials* 2008,29(31):4157-63.
19. Bilhan H, Bilgin T, Cakir AF, Yuksel B, Von Fraunhofer JA. The effect of mucine, IgA, urea, and lysozyme on the corrosion behaviour of various non-precious dental alloys and pure titanium in artificial saliva. *J Biomater Appl* 2007,22(3):197-221.
20. Bolto B, Gregory J. Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Res* 2007,41(11):2301-24.
21. Borodina TN, Rumsh LD, Kunizhev SM, Sukhorukov GB, Vorozhtsov GN, Fel'dman BM, Markvicheva EA. Polyelectrolyte microcapsules as systems for delivery of biologically active substances. *Biomed Khim* 2007,53(5):557-65.
22. Borodina TN, Rumsh LD, Kunizhev SM, Sukhorukov GB, Vorozhtsov GN, Fel'dman BM, Rusanova AV, Vasil'eva TV, Strukova SM, Markvicheva EA. Entrapment of herbal extracts in biodegradable Microcapsules. *Biomed Khim* 2007,53(6):662-71.
23. Boulmedais F, Frisch B, Etienne O, Lavallo P, Picart C, Ogier J, Voegel JC, Schaaf P, Egles C. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* 2004,25(11):2003-11.
24. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, Stoltz JF. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* 2003,24(20):3521-30.
25. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental studies. *J Prosthetic Dentistry* 1983,50:399-410.
26. Brétagnol F, Rauscher H, Hasiwa M, Kylián O, Ceccone G, Hazell L, Paul AJ, Lefranc O, Rossi F. The effect of sterilization processes on the bioadhesive properties and surface chemistry of a plasma-polymerized polyethylene glycol film: XPS characterization and L929 cell proliferation tests. *Acta Biomater* 2008,4(6):1745-51.
27. Brunot C. Films multicouches de polyélectrolytes sur titane et réponse cellulaire. Mémoire de DEA, Université Claude Bernard Lyon1, Lyon 2004.
28. Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosgeat B. Cytotoxicity of polyethylenimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayers films. *Biomaterials* 2007,28(4):632-40.
29. Brunot C, Grosgeat B, Picart C, Lagneau C, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium. *Dent Mater* 2008,24(8):1025-35.
30. Buehler WJ, Wang FE. A summary of recent research on the nitinol alloys and their potential application in ocean engineering. *Ocean Eng* 1968,1:105-8.
31. Burke SE, Barrett CJ. pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules* 2003,4(6):1773-83.
32. Buron CC, Filiatre C, Membrey F, Peerot H, Foissy A. Mass and charge balance in self-assembled multilayer films on gold. Measurements with optical reflectometry and quartz crystal microbalance. *J Colloid Interface Sci* 2006,296(2):409-18.

33. Cai K, Hu Y, Jandt KD, Wang Y. Surface modification of titanium thin film with chitosan via electrostatic self-assembly technique and its influence on osteoblast growth behaviour. *J Mater Sci Mater Med* 2008,19,2:499-506.
34. Castellani R, Ruijter A, Renggli H, Jansen J. Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. *Clin Oral Impl Res* 1999,10: 369-78.
35. Channasanon S, Graisuwan W, Kiatkamjornwong S, Hoven VP. Alternating bioactivity of multilayer thin films assembled from charged derivatives of chitosan. *J Colloid Interface Sci* 2007,316(2):331-43.
36. Chua PH, Neoh KG, Kang ET, Wang W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials* 2008,29(10):1412-21.
37. Chen J, Luo G, Cao W. The study of layer-by-layer ultrathin films by the dynamic contact angle method. *J Colloid Interface Sci* 2001,238:62-9.
38. Cheng FT, Shi P, Man HC. Anatase coating on NiTi via a low-temperature sol-gel route for improving corrosion resistance. *Scripta Mater* 2004,51:1041-5.
39. Cheng FT, Shi P, Man HC. A preliminary study of TiO₂ deposition on NiTi by a hydrothermal method. *Surf Coat Technol* 2004,187:26-32.
40. Chin MY, Sandham A, de Vries J, van der Mei HC, Busscher HJ. Biofilm formation on surface characterized micro-implants for skeletal anchorage in orthodontics. *Biomaterials* 2007,28(11):2032-40.
41. Chluba J, Voegel JC, Decher G, Erbacher P. Peptide hormone covalently bound to Polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* 2001,2(3):800-5.
42. Cho M, Choi Y, Park H, Kim K, Woo GJ, Park J. Titanium dioxide/UV photocatalytic disinfection in fresh carrots. *J Food Prot.* 2007,70(1):97-101.
43. Cisse O, Savadogo O, Wu M, Yahia LH. Effet of surface treatment of NiTi alloy on its corrosion behaviour in Hanks' solution. *J Biomed Mater Res* 2002,61:339-45.
44. Clam C., Kim N., Hui D., Kwok Y., Hair ML., Neumann AW. The effect of liquid properties to contact angle hysteresis. *Colloids Surfaces* 2001,189(1-3):265-78.
45. Colella G, Tartaro G, Cannavale R, Lanza A, Marulo F. Effects of repeated cycles of sterilisation on the mechanical characteristics of titanium miniplates for osteosynthesis. *J Oral Maxillofac Surg* 2008,46(6):449-54.
46. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* 1997,277:1232-7.
47. Deilmann M, Halfmann H, Bibinov N, Wunderlich J, Awakowicz P. Low-pressure microwave plasma sterilization of polyethylene terephthalate bottles. *J Food Prot* 2008,71(10):2119-23
48. Den Brader ET, Ruijter JE, Smits HT, Ginsel LA, Von Recum AF, Jansen JA. Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J Biomed Mater Res* 1995,29:511-8.
49. Devine DA, Keech AP, Wood DJ, Killington RA, Boyes H, Doubleday B, Marsh PD. Ultraviolet disinfection with a novel microwave-powered device. *J Appl Microbiol*, 2001,91:789-94.

50. Di Fiore PM. A Dozen ways to prevent nickel-titanium rotary instrument fracture. *J Am Dent Assoc* 2007,138(2):196-201.
51. Dong P, Hao W, Wang X. Fabrication and biocompatibility of polyethyleneimine/heparin self-assembly coating on NiTi alloy. *Thin Solid Films* 2007,516,16:5168-71.
52. Dootz R, Nie J, Du B, Herminghaus S, Pfohl T. Raman and surface enhanced raman microscopy of microstructured polyethylenimine/dna multilayers. *Langmuir* 2006,22(4):1735-41.
53. Dubois JC, Jardin C, Exbrayt P, Lissac M, Treheux D. Influence of gamma-irradiation sterilization on the structural defects of sapphire single crystals (α -Al₂O₃). *Biomed Mater Eng* 2001, 11(3):265-73.
54. Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials* 1996,17(14):1399-403.
55. Eisenbarth E, Velten D, Schenk-Meuser K, and al. Interactions between cells and titanium surfaces. *Biomol Eng* 2002,19(2-6):243-9.
56. Elzbieciak M, Zapotoczny S, Nowak P, Krastev R, Nowakowska M, Warszyński P. Influence of pH on the Structure of Multilayer Films Composed of Strong and Weak Polyelectrolytes. *Langmuir* 2009, in press.
57. El Medawar L, Rocher P, Hornez Jc, Traisnel M, Breme J, Hildebrand Hf. Electrochemical and cytocompatibility assessment of nitinol memory shape alloy for orthodontic use. *Biomol Eng* 2002,19:153-60.
58. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants - (I) Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 1998,106:527-51.
59. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants - (II) Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998,106:721-64.
60. Essouni M, Fischer-Brandies H. On the properties of two binary shape memory alloys. Effects of surface finish on the corrosion behaviour and *in vitro* biocompatibility. *Biomaterials*, 2002,23:2887-94.
61. Etienne O. Développement d'interfaces à propriétés antimicrobiennes par la fonctionnalisation de films multicouches de polyélectrolytes. Thèse d'Université, Université Louis-Pasteur Strasbourg1, 2004.
62. Etienne O, Picart C, Taddei C, Haikel Y, Dimarcq JL, Schaaf P, Voegel JC, Ogier JA, Egles C. Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob Agents Chemother* 2004,48(10):3662-9.
63. Etienne O, Gasnier C, Taddei C, Voegel JC, Aunis D, Schaaf P, Metz-Boutigue MH, Bolcato-Bellemin AL, Egles C. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials* 2005,26(33):6704-12.
64. Etienne O, Picart C, Taddei C, Keller P, Hubsch E, Schaff P, Voegel JC, Haikel Y, Ogier JA, Egles C. Polyelectrolyte multilayer film coating and stability at the surfaces of oral prosthesis base polymers : an *in vitro* and *in vivo* study. *J Dent Res* 2006,85(1):44-8.
65. Exbrayat P. La biocompatibilité des matériaux dentaires. *J Biomat Dent* 1998,13:177-202.
66. Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblasts. *Biomaterials* 2003,24(25):4663-70.

67. Firstov GS, Vitchev RG, Kumar H, Blanpain B, Van Humbeeck J. Surface oxidation of NiTi shape memory alloy. *Biomaterials* 2002,23(24):4863-71.
68. Fu J, Ji J, Yuan W, Shen J. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* 2005,26(33):6684-92.
69. Galtier F. La stérilisation. Paris, Arnette Blackwell,1996,93-119.
70. Garrec P, Tavernier B, Jordan L. Evolution of flexural rigidity according to the cross-sectional dimension of a superelastic nickel titanium orthodontic wire. *Eur J Orthod.* 2005,27(4):402-7.
71. Garg A, Heflin JR, Gibson HW, Davis RM. Study of film structure and adsorption kinetics of polyelectrolyte multilayer films: Effect of pH and polymer concentration. *Langmuir* 2008,24(19):10887-94.
72. Garza JM, Jessel N, Ladam G, Dupray V, Muller S, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Lavalle P. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartiment films. *Langmuir* 2005;21(26):12372-7.
73. Gergely C, Bahi S, Szalontai B, Flores H, Schaaf P, Voegel JC, Cuisinier FJ. Human serum albumin self-assembly on weak polyelectrolyte multilayer films structurally modified by pH changes. *Langmuir* 2004,22(20):5575-82.
74. Granger DN, Kvietys PR, Perry MA, Taylor AE. Charge selectivity of rat intestinal capillaries. Influence of polycations. *Gastroenterology* 1986,91(6):1443-6.
75. Grosogeat B, Pernier C, Schiff N, Comte V, Huet A. Résistance à la corrosion et biocompatibilité des fils orthodontiques. *Orthod Fr* 2003,74:115-21.
76. Grosogeat B, Jablonska E, Vernet JM, Jaffrezic N, Lissac M, Ponsonnet L. Tribological response of sterilized and un-sterilized orthodontic wires. *Mater Sci Eng C* 2006, 26:267-72.
77. Guizzardi S, Galli C, Martini D and al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol* 2004,75(2):273-82.
78. Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ. Integrine expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1997,12(8):1189-97.
79. Haga M, Fujii N, Nozawa-Inoue K, Nomura S, Oda K, Uoshima K, Maeda T. Detailed process of bone remodeling after achievement of osseointegration in a rat implantation model. *Anat Rec (Hoboken)* 2008.
80. Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Moses RL, Jacobs JJ. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue Eng* 2001,7(1):55-71.
81. Hauser J, Halfmann H, Awakowicz P, Köller M, Esenwein SA. A double inductively coupled low-pressure plasma for sterilization of medical implant materials. *Biomed Tech* 2008,53(4):199-203.
82. Hélyary G, Noirclère F, Mayingi J, Migonney V. A new approach to graft bioactive polymer on titanium implants: Improvement of MG-63 cell differentiation onto this coating. *Acta Biomater.* 2008, in press.
83. Hermitte L, Thomas F, Bougaran R, Martelet C. Contribution of the comonomers to the bulk and surface properties of methacrylate copolymers. *J Colloid Interface Sci* 2004,272(1):82-9.
84. Huang HH. Corrosion resistance of stressed NiTi and stainless steel orthodontic wires in acid artificial saliva. *J Biomed Mater Res A* 2002,66(4):829-39.

85. Huang N, Yang P, Leng YX, Chen JY, Sun H, Wang J, Wang GJ, Ding PD, Xi TF, Leng Y. Hemocompatibility of titanium oxide films. *Biomaterials* 2003,25:625-31.
86. Huang HH, Chiu YH, Lee TH, Wu SC, Yang HW, Su KH, Hsu CC. Ion release from NiTi orthodontic wires in artificial saliva with various acidities. *Biomaterials* 2003,24:3585-92.
87. Huang HH. Variation in corrosion resistance of nickel-titanium wires from different manufacturers. *Angle Orthod* 2005,75:661-5.
88. Hubbe M, North California State University, Mini-Encyclopedia of Papermaking Wet-End Chemistry, document disponible sur internet www4.ncsu.edu/~hubbe/PEI.htm.
89. Imbeni V, Martini C, Prandstraller D, Poli G, Trepanier C, Duerig TW. Preliminary study of microscale abrasive wear of a NiTi shape memory alloy. *Wear* 2003,254:1299-306.
90. Jain R, Von Recum AF. Effect of titanium surface texture on the cell-biomaterial interface. *J Invest Surg* 2003;16(5):263-73.
91. Jain R, Von Recum AF. Fibroblast attachment to smooth and microtextured PET and thin cp-Ti films. *J Biomed Mater Res A* 2004,1,68(2):296-304.
92. Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, Joss U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004,25(4):625-31.
93. Jessel N, Atalr F, Lavallo P, Mutterer J, Decher G, Schaaf P. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv Mater* 2003,15(9):692-5.
94. Jiang HC, Rong LJ. Effect of hydroxyapatite coating on nickel release of the porous NiTi shape memory alloy fabricated by SHS method. *Surf Coat Technol* 2006,201:1017-21.
95. Jones MI, MacColl IR, Grant DM, Parker KG, Parker TL. Protein adsorption and platelet attachment and activation, on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res* 2000,52(2):413-21.
96. Jordan L, Filleul MP, Portier R. Les arcs orthodontiques à mémoire de forme : structure et propriétés. *Rev Orthop Dento Faciale* 1997,31:199-211.
97. Ju X, Dong H. Plasma surface modification of NiTi shape memory alloy. *J Surf Coat* 2006,201:1542-7.
98. Kanjickal D, Lopina S, Evancho-Chapman MM, Schmidt S, Donovan D. Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2008,87(3):608-17.
99. Kapanen A, Ryhanen J, Danilov A, Tuukkanen J. Effect of nickel-titanium memory metal alloy on bone formation. *Biomaterials* 2001,22:2475-80.
100. Kapanen A, Kinnunen A, Ryhanen J, Tuukkanen J. TGF- β 1 secretion of ROS-17/2.8 cultures on NiTi implant material. *Biomaterials* 2002,23:3341-6.
101. Keller JC, Schneider GB., Stanford CM., Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 2003,12(2):175-81.
102. Khopade AJ, Caruso F. Surface modification of polyelectrolyte multilayer coated particles for biological applications. *Langmuir* 2003,19:6219-25.
103. Kilpadi DV, Raikar GN, Lemons JE, Vohra Y, Gregory JC. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Clin Oral Implants Res* 1997,8:208-16.

104. Kim TY, Park KH, Rho SG, Kim SJ, Cho SY. Bactericidal effect of TiO₂ on the selected vibrio parahaemolyticus and optimization using response surface methodology. *J Nanosci Nanotechnol* 2007,7(11):3709-12.
105. Kobayashi S, Ohgoe Y, Ozeki K, Sato K, Sumiya T, Hirakuri KK, Aoki H. Dissolution effect and cytotoxicity of Diamond-like carbon coatings on orthodontic archwires. *J Mater Sci Mater Med* 2007,18(12):2263-8.
106. Köhler K, Déjugnat C, Dubois M, Zemb T, Sukhorukov GB, Guttman P, Möhwald H. Soft X-ray microscopy to characterize polyelectrolyte assemblies. *J Phys Chem B* 2007,26,111(29):8388-93.
107. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals : preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med* 2004,15(2):99-107.
108. Kuphasuk C, Oshida Y, Andres CJ, Hovijitra ST, Barco MT, Brown DT. Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys. *J Prosthet Dent* 2001,85:195-202.
109. Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, Cuisinier F. Protein interactions with polyelectrolyte multilayers : interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate / polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules* 2000,1:674-88.
110. Ladam G, Schaaf P, Voegel JC, Decher G, Cuisinier F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 2001,16(3):1249-55.
111. Ladhari N, Hemmerle J, Ringwald C, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Ball V. Stratified PEI-(PSS-PDADMAC)(20)-PSS-(PDADMAC-TiO₂)(n) multilayer films produced by spray deposition. *Colloid Surf A - Physicochem Eng Aspects* 2008,322(1-3):142-7.
112. Lakard S, Herlem G, Propper A, Kastner A, Michel G, Vallès-Villarreal N, Gharbi Y, Fahys B. Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. *Bioelectrochemistry* 2004,62(1):19-27.
113. Lakhssassi N, Cousty S, Villegier S, Diouf A, Ricard A, Sixou M. Bacterial DNA alteration by plasma generated atomic nitrogen. Real-time PCR detection contribution. *Pathol Biol* 2006,54(8-9):482-7.
114. Lane TJ, Fletcher WR, Gormally MV, Johal MS. Dual-beam polarization interferometry resolves mechanistic aspects of polyelectrolyte adsorption. *Langmuir* 2008,24(19):10633-6.
115. Lauer G, Wiedmann-Al-Ahmad M, Otten JE, Hubner U, Schemelzisen R, Schilli W. The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2001,22(20):2799-809.
116. Lavallo P, Gercely C, Cuisinier FJ, Decher G, Schaaf G, Voegel JC, Picart C. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime : a in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* 2002,35(11):4458-65.
117. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Mater* 2007,23:844-54.
118. Leguen E, Chassepot A, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Jessel N. Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs. *Biomol Eng* 2007,24(1):33-41.
119. Lee DH, Sim GS, Kim JH, Lee GS, Pyo HB, Lee BC. Preparation and characterization of quercetin-loaded polymethyl methacrylate microcapsules using a polyol-in-oil-in-polyol emulsion solvent evaporation method. *J Pharm Pharmacol* 2007,59(12):1611-20.

120. Lee J, Zoh K, Ko G. Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. *Appl Environ Microbiol* 2007,74(7):2111-7.
121. Li SJ, Cui TC, Hao YL, Yang R. Fatigue properties of a metastable (beta)-type titanium alloy with reversible phase transformation. *Acta Biomater* 2008,4(2):305-17.
122. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR et al. Response of MG-63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998,19:2219-32.
123. Liu L, Won YJ, Cooke PH, Coffin D, Fishman M, Hicks K, Ma P. Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. *Biomaterials* 2004,25(16):3201-10.
124. Mac Donald DE, Rapuano BE, Deo N, Stranick M, Somasundaran P, Boskey AL. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials : effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG-63 cell attachment. *Biomaterials* 2004,25(16):3135-46.
125. Mac Spaden JT. Une nouvelle approche pour la préparation et l'obturation canalaire : les instruments mécanisés en NiTi et la gutta-percha multiphases. *J Endod* 1993,12(1):9-19.
126. Mahé M. Autoclave de cabinet : mythe ou réalité. *Acta Endoscopica* 1998, n° spécial CREGG, 28:463-5.
127. Mahmdi L, Picart C, Lagneau L, Othmane A, Grogogeat B, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. Study of the polyelectrolyte multilayer thin films properties and correlation with the behavior of the human gingival fibroblasts. *Mater Sci Eng* 2006,26:273-281.
128. Man HC, Zhang S, Cheng FT, Guo X. Laser fabrication of porous surface layer on NiTi shape memory alloy. *Mater Sci Eng A* 2005,404:173-8.
129. Maurin AC, Fromental R, Cantaloube B, Caterini R. Porous tantalum and nitinol colonization by human osteoblasts in three-dimensional cell cultures. *Implantodontie* 2005,14(2):44-50.
130. Matsumara K, Hyon SH, Nakajima N, Peng C, Iwata H, Tsutsumi S. Adhesion between polyethylene-co-vinyl alcohol (EVA) and titanium. *J Biomed Mater Res* 2003,60(2):309-15.
131. Mayingi J, Hélarly G, Noirclere F, Bacroix B, Migonney V. Grafting of bioactive polymers onto titanium surfaces and human osteoblasts response. *ITBM-RBM* 2008,29(1):1-6.
132. Meling TR, Odegaard J. The effect of short-term temperature changes on superelastic nickel-titanium archwires activated in orthodontic bending. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001,119(3):263-73.
133. Mészáros R, Varga I, Gilányi T. Adsorption of poly(ethyleneimine) on silica surfaces: effect of pH on the reversibility of adsorption. *Langmuir* 2004,20(12):5026-9.
134. Meyer RD, Meyer J, Taloumis LJ. Intra-oral galvanique corrosion : litterature review and case report. *J Prosthet Dent* 1993,69:141-3.
135. Moby V, Kadi A, De Isla N, Stoltz JF, Menu P. Polyelectrolyte multilayer films : Effect of the initial anchoring layer on the cell growth. *BioMed Mater Eng* 2008,18,4-5:199-204.
136. Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity : implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther* 2005,11(6):990-5.

137. Moisan, Barbeau, Moreau, Pelletier, Tabrizian, Yahia. Low temperature sterilisation using gas plasma : a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanism . *Inter J Pharmac* 2001,226:1-21.
138. Monna, Nguyen, Kahil, Ricard, Sixou. Sterilisation of dental bacteria in a flowing N₂-O₂ post-discharge reactor. *IEEE-TPS* 2002.
139. Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y, Fumoto S, Yamashita F, Hashida M. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol Ther* 2003,7(2):254-261.
140. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;16,65(1-2):55-63.
141. Morra M, Cassinelli C. Organic surface chemistry on titanium surfaces via thin film deposition. John Wiley & Sons, Inc 1997, Nobil Bio Recherche.
142. Muller S, Koenig G, Charpiot A, Debry C, Voegel, JC, Lavalle P, Vautier D. Title: VEGF-functionalized polyelectrolyte multilayers as proangiogenic prosthetic coatings. *Adv Funct Mater* 2008,18(12):1767-75.
143. Muñoz Javier A, Del Pino P, Bedard MF, Ho D, Skirtach AG, Sukhorukov GB, Plank C, Parak WJ. Photoactivated release of cargo from the cavity of polyelectrolyte capsules to the cytosol of cells. *Langmuir* 2008, in press.
144. Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res* 1999,34(7):425-30.
145. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez B, Arvdson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Impl Res* 2001,12:515-25.
146. Nakamura H, Tanaka M, Shinohara S, Gotoh M, Karube I. Development of a self-sterilizing lancet coated with a titanium dioxide photocatalytic nano-layer for self-monitoring of blood glucose. *Biosens Bioelectron* 2007,22(9-10):1920-5.
147. Nomoto T, Onishi H. Fourth-order coherent Raman spectroscopy in a time domain : applications to buried interfaces. *J Chem Phys* 2007,9(41):5515-21.
148. Nomoto T, Onishi H. Fourth-order raman spectroscopy of adsorbed organic species on TiO₂ surface. *Chemical Physics Letters* 2008,455(4-6):343-7.
149. Olivieri MP, Rittle KH, Tweden KS, Loomis RE. Comparative biophysical study of adsorbed calf serum, foetal bovine serum and mussel adhesive protein films. *Biomaterials* 1992,13:201-8.
150. O'Neal RB, Sauk JJ, Somerman MJ. Biological requirements for materials integration. *J Oral Implantol* 1992,18(3):243-55.
151. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ. An energy-dispersive X-ray analysis and SEM study of debris remaining on endodontic instruments after ultrasonic cleaning and autoclave sterilization. *Aust Endod J* 2005,31(2):53-8.
152. Pasqui D, Rossi A, Di Cintio F, Barbucci R. Functionalized titanium oxide surfaces with phosphated carboxymethyl cellulose : characterization and bonelike cell behavior. *Biomacromolecules* 2007,8(11):3531-9.

153. Patoor E, Berveiller M. Technologie des alliages à mémoire de forme. Paris, Hermès, 1994,63-87.
154. Pelletier H, Muller D, Mille P, Grob, JJ. Effect of high energy argon implantation into NiTi shape memory alloy. Surf Coat Technol 2002,158:301-8.
155. Pernier C, Grosogeat B, Ponsonnet L, Benay G, Lissac M. Influence of autoclave sterilization on the surface parameters and mechanical properties of six orthodontic wires. Eur J Orthod 2005,27(1):72-81.
156. Picart C, Lavallo P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C. Buildup mechanism for poly-L-Lysine/Hyaluronan acid films onto a solid surface. Langmuir 2001,17(23):7414-24.
157. Picart C, Ladam G, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Gergely C. Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods : a comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. J Chem Phys 2001,115(2):1086-94.
158. Picart C, Schneider A, Etienne O, Mutterer J, Schaaf P, Egles C, Jessel N, Voegel JC. Controlled degradability of polysaccharide multilayer films *in vitro* and *in vivo*. Adv Funct Mater 2005,15:1771-80.
159. Piculell L, Santore M. Polyelectrolytes. Curr Opin Colloid Interface Sci 2008,13(6):375.
160. Pinzari F, Ascarelli P, Cappelli E, Giorgi R Wettability modification of titanium sheets induced by actived surface treatment. Langmuir 2002,18(14):5457-61.
161. Pitt WG, Morris RN, Mason ML, Hall MW, Luo Y, Prestwich GD. Attachment of hyaluronan to metallic surfaces. J Biomed Mater Res A 2004,68:95-106.
162. Poon RWY, Yeung KWK, Liu XY, Chu PK, Chung CY, Lu WW, Cheung KMC, Chan D. Carbon plasma immersion ion implantation of nickel-titanium shape memory alloys. Biomaterials 2005,26:2265-72.
163. Poon RWY, Ho JPY, Luk CMY, Lu X, Chung JCY, Chu PK, Yeung KWK, Lu WW, Cheung KMC. Improvement on corrosion resistance of NiTi orthopaedic materials by carbon plasma immersion ion implantation. Nucl Instrum Methods Physics Res B 2006,242:270-4.
164. Ponsonnet L, Comte V, Othomane A, Lagneau C, Charbonnier M, Lissac M, Jaffrezic N. Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth fibroblast on nickel-titanium substrates. Mater Sci Eng C 2002,21:157-65.
165. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, Martelet C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. Mater Sci Eng C 2003,23:551-60.
166. Porcel C, Lavallo P, Ball V, Decher G, Senger B, Voegel JC, Schaaf P. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. Langmuir 2006,22(9):4376-83.
167. Porcel C, Lavallo P, Decher G, Senger B, Voegel JC, Schaaf P. Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime. Langmuir 2007,23(4):1898-904.
168. Porté-Durrieu MC, Guillemor F, Amedee R, Barcille R, Dard M, Baquey Ch. Greffage de peptides d'adhésion sur matériaux titane – Développement de nouveaux substituts osseux. JADH 2001,129-132.

169. Prymak O, Bogdanski D, Koller M, Esenwein SA, Muhr G, Beckmann F, Donath T, Assad M, Epple M. Morphological characterization and *in vitro* biocompatibility of a porous nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 2005,26:5801-7.
170. Pröbster L, Lin W, Hütteman H. Effect of fluoride prophylactic agents on titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992,7:390-4.
171. Reddi A. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology* 1998,16:247-52.
172. Ren K, Wang Y, Ji J, Lin Q, Shen J. Construction and deconstruction of PLL/DNA multilayered films for DNA delivery: Effect of ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005,46(2):63-9.
173. Richards RG. The effect of surface roughness on fibroblast adhesion *in vitro*. *Injury*. 1996,27 Suppl 3:SC38-43.
174. Richert L, Lavallo P, Payan E, Shu XZ, Prestwich GD, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Layer by layer buildup of polysaccharide films : physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* 2004,20(2):448-58.
175. Richert L, Boulmedais F, Lavallo P, Mutterer J, Ferreux F, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* 2004,5(2):284-94.
176. Rocher P, El Medawar L, Hornez JC, Traisnel M, Breme J, Hildebrand HF. Biocorrosion and cytocompatibility assessment of NiTi shape memory alloys. *Scripta Mater* 2004,50:255-60.
177. Roques C, Fattal E, Fromes Y. Comparison of toxicity and transfection efficiency of amphiphilic block copolymers and polycationic polymers in striated muscles. *J Gene Med* 2009, in press.
178. Rupp F, Axmann D, Ziegler C, Geis-Gerstorfer J. Adsorption/ desorption phenomena on pure and Teflon AF-coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis. *J Biomed Mater Res* 2002,62(4):567-78.
179. Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 2004,25(7-8):1429-38.
180. Ryhanen J. Biocompatibility of nitinol. *Min Invas Ther Technol* 2000,9(2):99-106.
181. Sabot A, Krause S. Simultaneous quartz crystal microbalance impedance and electrochemical impedance measurements : Investigation into the degradation of thin polymer films. *Anal Chem* 2002,15(74):3304-11.
182. Sachdeva R, Fukuyo S, Suzuhi K, Oshida Y, Miyazaki S. Shape memory NiTi alloys application in dentistry. *Mater Sci Forum* 1990,56-58:693-8.
183. Sargeant TD, Rao MS, Koh CY, Stupp SI. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 2008,29(8):1085-98.
184. Sarkar NK, Redmond W, Schwanninge RB, Goldberg AJ. The chloride corrosion behaviour of four orthodontic wires. *J Oral Rehabil* 1983,10:121-8.
185. Sato Y. Effect of surface modification using laser on wear resistance of titanium. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi*. 2005,49(1):46-55.
186. Satsangi A, Satsangi N, Glover R, Satsangi RK, Ong JL. Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface. *Biomaterials* 2003,24(25):4585-9.

187. Schaaf P et Voegel JC. Films bioactifs destinés au recouvrement de biomatériaux et ciblant une régénération tissulaire : de nouvelles voies originales ? *Pathol Biol* 2002,50:189-93.
188. Schiff N, Grosogeat B, Lissac M, Dalard F. Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys. *Biomaterials* 2002,23:1995-2002.
189. Schiff N, Grosogeat B, Lissac M, Dalard F. Influence of fluoridated mouthwashes on corrosion resistance of orthodontics wires. *Biomaterials* 2004,25(19):4535-42.
190. Schlenof, JB, Dubas ST, Farhat T. Sprayed polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 2000,16:9968-9.
191. Schneider A, Francius G, Obeid R, Schwinte P, Hemmerle J, Frisch B, Schaaf P, Voegel JC, Senger B, Picart C. Polyelectrolyte multilayers with a tunable young's modulus : Influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir* 2006,22(3):1193-200.
192. Schneider A, Richert L, Francius G, Voegel JC, Picart C. Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films. *Biomed Mater* 2007,2(1):45-51.
193. Schneider G, Decher G. Functional core/shell nanoparticles via layer-by-layer assembly : investigation of the experimental parameters for controlling particle aggregation and for enhancing dispersion stability. *Langmuir* 2008,4,24(5):1778-89.
194. Schnitman PA, Brånemark PI. Implants loaded with fixed provisionnal prosthesis at fixture placement : nine year follow. *J Oral Implantology* 1995,21:235-41.
195. Schulte A, Belger S, Etienne M, Schulmann W. Imaging localized corrosion of NiTi memory alloys by means of alternating current scanning electrochemical microscopy (AC-SECM). *Mater Sci Eng A* 2004,378:523-6.
196. Semmling M, Kreft O, Muñoz Javier A, Sukhorukov GB, Käs J, Parak WJ. A novel flow-cytometry-based assay for cellular uptake studies of polyelectrolyte microcapsules. *Small* 2008,4(10):1763-8.
197. Shevchenko N, Pham M, Maitz MF. Studies of surface modified NiTi alloy. *App Surf Sci* 2004,235:126-31.
198. Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients : a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res* 2008,19(8):823-35.
199. Sirghi L, Nakamura M, Hatanaka Y, Takai O. Atomic force microscopy study of hydrophilicity of TiO₂ thin films obtained by radio frequency magnetron sputtering and plasma enhanced chemical vapor depositions. *Langmuir* 2001,17(26):8199-203.
200. Sobaszek A, Fantoni S, Victoire G, Frimat P, Furon D. Ethylene oxide: technical and organizational evaluation in a sterilization unit at Lille's university hospital. *Arch Mal Prof Med Trav* 1999,60:441-2.
201. Sonntag D, Peters O. Effect of prion decontamination protocols on Nickel-Titanium rotary surfaces. *J Endod* 2007,33: 442-6.
202. Soumetz FC, Pastorino L, Ruggiero C. Human osteoblast-like cells response to nanofunctionalized surfaces for tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl. Biomater* 2008,84(1):249-55.
203. Speck KM, Fraker AC. Anodic polarization behaviour of Ti-Ni and Ti-6Al-4V in simulated physiological solutions. *J Dent Res* 1980,59(10):1590-5.

204. Stine JJ, Palmer CP. Covalent modification of fused silica capillaries with quaternized polyamines to achieve robust and stable anodic electroosmotic flow. *J Sep Sci* 2009,32(3):446-56.
205. Tan Q, Ji J, Barbosa MA, Fonseca C, Shen J. Constructing thromboresistant surface on biomedical stainless steel via layer-by-layer deposition anticoagulant. *Biomaterials* 2003,24(25):4699-705.
206. Thierry B, Tabrizian M, Savadogo O, Yahia L. Effect of sterilization processes on NiTi alloy : surface characterization. *J Biomed Mater Res* 2000, 49(1):88-98.
207. Thierry B, Tabrizian M, Trépanier C, Savadogo O, Yahia L. Effect of surface treatment and sterilization processes on the corrosion behaviour of NiTi shape memory alloy. *J Biomed Mater Res* 2000,51(4):685-93.
208. Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* 2003,4:1564-71.
209. Tosatti S., De Paul S-M., Askendal A., VandeVondele S., Hubbell, Tengvall P., Textor M. Peptide functionalized poly-L-Lysine-g-poly-ethylene-glycol on titanium : resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma. *Biomaterials* 2003,24:4949-58.
210. Tosatti S, Schwartz Z, Campbell C et al. RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)-coated titanium surfaces. *Wiley Periodicals Inc* 2003, 458-72.
211. Triplett RG, Froberg U, Sykaras N, Woody RD. Implant materials, design, and surface topographies : their influence on osseointegration of dental implants. *J Long Term Eff Med Implants* 2003,13(6):485-501.
212. Tryoen-Toth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res* 2002,15,60(4):657-67.
213. Tryoen-Toth P, Vautier D, Chluba J et Ogier J. Films de polyélectrolytes auto-assemblés : une voie originale de modification des surfaces biologiques pour l'ostéo-intégration. *Les Cahiers de l'ADF* 2002, n°12-13.
214. Tsutsui T, Hirokawa Y, Maizumi H. Long-term cultivation of fibroblasts derived from normal gingival tissues of human adults. *J Med Sci Biol* 1973,26(4):169-77.
215. Valois CR, Silva LP, Azevedo RB. Multiple autoclave cycles affect the surface of rotary nickel-titanium files: an atomic force microscopy study. *J Endod* 2008,34(7):859-62.
216. Vasconcelos LMR, Oliveira MV, Graca MLA, et al. Design of dental implants, influence on the osteogenesis and fixation. *J Mater Sci Mater Med* 2007,19(8):2851-7.
217. Vautier D, Hemmerlé J, Vodouhe C, Koenig G, Richert L, Picart C, Voegel JC, Debry C, Chluba J, Ogier J. 3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003,56(3):147-58.
218. Verheye S, Markou CP, Salame MY, Wan B, King SB 3rd, Robinson KA, Chronos NA, Hanson SR. Reduced thrombus formation by hyaluronic acid coating of endovascular devices. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000,20(4):1168-72.
219. Viana AC, Gonzalez BM, Buono VT, Bahia MG. Influence of sterilization on mechanical properties and fatigue resistance of nickel-titanium rotary endodontic instruments. *Int Endod J* 2006,39(9):709-15.

220. Vicennati P, Giuliano A, Ortaggi G, Masotti A. Polyethylenimine in medicinal chemistry. *Curr Med Chem* 2008,15(27):2826-39.
221. Vodouhê C, Schmittbuhl M, Boulmedais F and al. Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on motoneuron growth. *Biomaterials* 2005,26(5):545-54.
222. Voegel JC, Decher G, Schaaf P. Multicouches de polyélectrolytes dans le domaine des biotechnologies. *Actualité chimique* 2003,269:30-8.
223. Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Coll Interface Sci* 1998,74:69-117.
224. Walia H, Brantly W, Gerstein H. An initial investigation of the bending and torsional properties of Nitinol root canal files. *J Endod* 1988,14:346-51.
225. Wang ZJ, Qian L, Wang XL, Yang F, Yang XR . Construction of hollow DNA/PLL microcapsule as a dual carrier for controlled delivery of DNA and drug. *Colloid Surf A - Physicochem Eng Aspects* 2008,326(1-2):29-36.
226. Wattendorf U, Kreft O, Textor M, Sukhorukov GB, Merkle HP. Stable stealth function for hollow polyelectrolyte microcapsules through a poly(ethylene glycol) grafted polyelectrolyte adlayer. *Biomacromolecules* 2008,9(1):100-8.
227. Werner S, Huck O, Frisch B, Vautier D, Elkaim R, Voegel JC, Brunel G, Tenenbaum H. The effect of microstructured surfaces and laminin-derived peptide coatings on soft tissue interactions with titanium dental implants. *Biomaterials*, 2009, in press.
228. Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM, Van Horn JR. Cytotoxicity, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 1997,18:1115-20.
229. Wever DJ, Veldhuizen AG, De Vries J, Busscher HJ, Uges DRA, Van Horn JR. Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 1998,19:761-9.
230. Williams DF. Definitions in Biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European society for Biomaterials. Chester, England, Elsevier 1987.
231. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008,29(20):2941-53.
232. Wirth C, Comte V, Lagneau C, Exbrayat P, Lissac M, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. Nitinol surface roughness modulates *in vitro* cell response : a comparison between fibroblasts. *Mater Sci Eng C* 2004,25:51-60.
233. Wirth C, Grosogeat B, Lagneau C, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. Biomaterial surface properties modulate *in vitro* rat calvaria osteoblasts response: Roughness and or chemistry ? *Mater Sci Eng C* 2008,SI,28(5-6):90-1001.
234. Yang SY, Rubner MF. Micropatterning of polymer thin films with pH-sensitive and cross-linkable hydrogen-bonded polyelectrolyte multilayers. *J Am Chem Soc* 2002,124:2100-1.
235. Yeung KW, Poon RW, Chu PK, Chung CY, Liu XY, Lu WW, Chan D, Chan SC, Luk KD, Cheung KM. Surface mechanical properties, corrosion resistance, and cytocompatibility of nitrogen plasma-implanted nickel-titanium alloys : a comparative study with commonly used medical grade materials. *J Biomed Mater Res A* 2007,82(2):403-14.
236. Youngblood T, Ong JL. Effect of plasma-glow discharge as a sterilization of titanium surfaces. *Implant Dent* 2003,12(1):54-60.
237. Yoshida K, Kamada K, Sato K, Hatada R, Baba K, Atsuta M. Thin sol-gel-derived silica coatingd on dental pure titanium casting. *J Biomed Mater Res* 1999,48(6):778-85.

238. Yuan Y, Chesnutt BM, Wright L, Haggard WO, Bumgardner JD. Mechanical property, degradation rate, and bone cell growth of chitosan coated titanium influenced by degree of deacetylation of chitosan. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008,86(1):245-52.
239. Zhao J., Cai XM., Tang HQ., Liu T, Gu HQ, Cui RZ. Bactericidal and biocompatible properties of TiN/Ag multilayered films by ion beam assisted deposition. *J Mater Sci Mater Med* 2008, in press.
240. Zitter H et Plenk HJ. The electrochemical behaviour of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *J Biomed Mater Res* 1987,21(7):881-96.
241. Zheng Z, Wei Y, Wang G, Gong Y, Zhang X. Surface characterization and cytocompatibility of three Chitosan/polycation composite membranes for guided bone regeneration. *J Biomater Appl* 2008.
242. Zhou J, Pavon-Djavid G, Anagnostou F, Migonney V. Inhibition de l'adhérence de *Porphyromonas gingivalis* sur la surface de titane greffé de poly(styrène sulfonate de sodium). *IRBM* 2007,28(1):42-8.
243. Zhu H, Ji J, Shen J. Construction of multilayer coating onto poly-DL-Lactide to promote cytocompatibility. *Biomaterials* 2004,25:109-17.

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS**

Publications internationales			
Revue à comité de lecture			
2008	Dental Materials Dent Mater. 2008;24(8):1025-35.	Brunot C. Grosogeat B. Lagneau C. Picart C. Ponsonnet L.	Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium
2007	Biomaterials 2007;28(4):632-40	Brunot C. Ponsonnet L. Lagneau C. Farge P. Picart C. Grosogeat B.	Cytotoxicity of Polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films.
Publications courtes - livre des résumés			
2006 oct	Brunot C. Grosogeat B. Lagneau C. Picart C. Ponsonnet L.	Films de polyélectrolytes sur titane : propriétés physico-chimiques et étude biologique.	5 ^{èmes} Journées Maghreb-Europe (MADICA) Mahdia Tunisie
2006 sept	Brunot C. Ponsonnet L. Picart C. Lagneau C. Grosogeat B.	Cytotoxicity of Polyethyleneimine (PEI) adsorbed onto biomaterial surfaces	European Society on Biomaterials (ESB) 20 th European Conference on Biomaterials Nantes France
2005 sept	Brunot C. Ponsonnet L. Lagneau C. Jaffrezic N. Picart C. Grosogeat B.	Cell behavior at surface of polyelectrolyte films deposited on titanium	International Association for Dental Research (IADR) Amsterdam Netherland

Publications nationales			
Thèse d'Etat pour le diplôme de Docteur en Chirurgie-Dentaire			
2008 janv	Duret Alexandre	Les états de surface des alliages nickel-titane Co-direction de thèse : Brunot C. et Grosogeat B.	Université de Lyon1 Faculté d'Odontologie Lyon
Posters			
2006 oct	Brunot C. Ponsonnet L. Lagneau C. Farge P. Picart C. Grosogeat B.	Cytotoxicity of Polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolytes multilayer films	Assemblée Nationale de la Recherche en Odontologie (ANRO) Paris
2006 oct	Brunot C. Grosogeat B. Lagneau C. Picart C. Ponsonnet L.	Films de polyélectrolytes sur titane : propriétés physico-chimiques et étude biologique	8 ^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie Lyon
2006 juin	Brunot C. Ponsonnet L. Picart C. Lagneau C. Grosogeat B.	Titane fonctionnalisé par des films de polyelectrolytes : l'état de surface de demain en implantologie ?	Journées pour la Maîtrise des Technologies de Mesure (ARATEM) St Etienne
2005 mars	Brunot C. Grosogeat B. Lagneau C. Picart C. Ponsonnet L.	Les films de polyelectrolytes sur titane : une nouvelle approche des implants dentaires	Bioadh'2005 Bioadhésion, Biocontamination des surfaces Bordeaux

Communications internationales - Posters			
2006 oct	Brunot C. Grosogeat B. Lagneau C. Picart C. Ponsonnet L.	Films de polyélectrolytes sur titane : propriétés physico-chimiques et étude biologique	MADICA Mahdia Tunisie
2006 oct	Brunot C. Ponsonnet L. Picart C. Lagneau C. Grosogeat B.	Cytotoxicity of Polyethyleneimine (PEI) adsorbed onto biomaterial surfaces	ESB Nantes France
2005 sept	Brunot C. Ponsonnet L. Lagneau C. Jaffrezic N. Picart C. Grosogeat B.	Cell behavior at surface of polyelectrolyte films deposited on titanium	IADR Amsterdam Netherland

Communications nationales - Posters			
2006 oct	Brunot C. Ponsonnet L. Lagneau C. Farge P. Picart C. Grosogeat B.	Cytotoxicity of Polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolytes multilayer films	ANRO Paris
2006 sept	Brunot C. Grosogeat B. Lagneau C. Picart C. Ponsonnet L.	Films de polyélectrolytes sur titane : propriétés physico-chimiques et étude biologique	8 ^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie Lyon
2005 mars	Brunot C. Grosogeat B. Lagneau C. Picart C. Ponsonnet L.	Titane fonctionnalisé par des films multicouches de polyélectrolytes et réponse cellulaire	Bioadhésion Bordeaux

Communications régionales			
Communications orales			
2005 mai	Brunot C. Grosogeat B.	Table ronde autour d'Industriels de la région Rhône-Alpes : « Les films de polyélectrolytes »	LEIBO Lyon
Posters			
2006 juin	Brunot C. Ponsonnet L. Picart C. Lagneau C. Grosogeat B.	Titane fonctionnalisé par des films de polyelectrolytes : l'état de surface de demain en implantologie ?	Innover dans les implants orthopédiques 6 ^e Journée Technique (ARATEM) St Etienne

ANNEXES

Annexe 1 : Brevet d'implant en NiTi.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

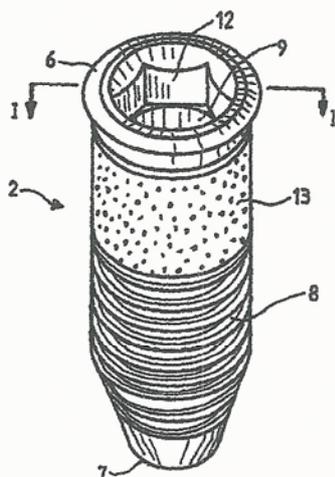
PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05325 A1

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Classification internationale des brevets⁷: A61C 8/00</p> <p>(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02008</p> <p>(22) Date de dépôt international: 12 juillet 2000 (12.07.2000)</p> <p>(25) Langue de dépôt: français</p> <p>(26) Langue de publication: français</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:
99/09273 16 juillet 1999 (16.07.1999) FR</p> <p>(71) Déposants et
(72) Inventeurs: CATERINI, Richard [FR/FR]; Le May, F-69530 Orlenas (FR). CANTALOUBE, Daniel [FR/FR]; 14 bis, rue Mautbaouron, F-78000 Versailles (FR). FROMENTAL, Robert [FR/FR]; Espace Brotteaux, 14, place Jules Ferry, F-69006 Lyon (FR).</p> | <p>(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): QUEYROY, Alain [FR/FR]; 20, place des Géants, F-38100 Grenoble (FR).</p> <p>(74) Représentant commun: CATERINI, Richard; Le May, F-69530 Orlenas (FR).</p> <p>(81) États désignés (national): CA, IL, US.</p> <p>(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée:
— Avec rapport de recherche internationale.</p> <p><i>En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.</i></p> |
|--|--|

(54) Title: DENTAL IMPLANT COMPRISING TWO BIOCOMPATIBLE MATERIALS

(54) Titre: IMPLANT DENTAIRE A DEUX MATERIAUX BIOCOMPATIBLES



(57) Abstract: The invention concerns a dental implant made of a first metal, comprising an external coating layer (13) and a second porous metal. The first metal is a shape-memory titanium alloy, preferably a Ti-Ni, Ti-Ni-Co or Ti-Ni-Fe alloy. The second porous metal is titanium, a titanium alloy, preferably a Ti-Ni, Ti-Ni-Co or Ti-Ni-Fe alloy having 20 % to 50 % open porosity and pore dimensions of 50 to 400 microns. The invention is useful for producing a dental prosthesis.

(57) Abrégé: Implant dentaire réalisé en un premier métal, comprenant une couche extérieure de revêtement (13) en un deuxième métal poreux. Le premier métal est un alliage à mémoire de forme, notamment un alliage de titane, de préférence, un alliage Ti-Ni, Ti-Ni-Co ou Ti-Ni-Fe. Le deuxième métal poreux est du titane, un alliage de titane, de préférence, un alliage Ti-Ni, Ti-Ni-Co ou Ti-Ni-Fe présentant de 20 % à 50 % de porosité ouverte et de 50 à 400 microns de dimensions de pores. Application à la réalisation d'une prothèse dentaire.



WO 01/05325 A1

Annexe 2 : Liste des normes françaises, européennes, et internationales.

Numéro	Année	Titre
EN 30993-5	1999	Evaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité in vitro.
NF S91 (142-146)	1988	Implants dentaires – Cytocompatibilité – 141 : Etude de la prolifération cellulaire, 142 : Etude de prolifération, 143 : Etude des protéines cellulaires totales, 144 : Evaluation du relargage extracellulaire du ⁵¹ Cr, 145 : Etude de la multiplication, la migration, et de l'adhésion cellulaire.
ISO 3630-1	1992	Art dentaire - Instruments pour canaux radiculaires - Partie 1: Exigences générales et méthodes d'essai.
NF T72-101	1981	Vocabulaire – Antisepsie, antiseptique, bactéricide, désinfection, désinfectant, ..., stérile, stérilisation,
EN 550	2001	Stérilisation des dispositifs médicaux – Validation et contrôle de routine pour la stérilisation à l'ETO.
EN 552	2001	Stérilisation des dispositifs médicaux – Validation et contrôle de routine pour la stérilisation par irradiation.
EN 554	2001	Stérilisation des dispositifs médicaux - Validation et contrôle de routine pour la stérilisation à la vapeur d'eau.
EN 556	2001	Exigences pour les produits de santé marqués « stériles ».
ISO 17665	2006	Stérilisation des produits de santé – Chaleur humide – Partie 1 : Exigences pour le développement, la validation et le contrôle de routine d'un procédé de stérilisation des dispositifs médicaux ; Partie 2: Directives relatives à l'application de l'ISO 17665-1.
ISO 11135	2010	Stérilisation des produits de santé – ETO, partie 1 : exigences de développement, de validation, et de contrôle de routine d'un procédé de stérilisation pour les dispositifs médicaux.
ISO 11137	2006	Stérilisation des produits de santé – Irradiation, partie 1 : exigences de développement, de validation, et de contrôle de routine d'un procédé de stérilisation pour les dispositifs médicaux ; Partie 2 : établissement de la dose stérilisante ; Partie 3 : directives relatives aux aspects dosimétriques.
ISO 11138	2006	Stérilisation des produits de santé - Indicateurs biologiques.
ISO 11140	2007	Stérilisation des produits de santé - Indicateurs chimiques.

Annexe 3 : Coordonnées des sociétés industrielles – Timet Savoie.

Société TIMET Savoie

Avenue Paul Girod
73400 Ugine, France
Tel : 04 79 89 73 73
Fax : 04 79 89 73 72

Site officiel internet : <http://www.ugine.com/fr/economie-industrie-timet.php>

Entreprise : Timet Savoie (SA Conseil Administration, n° Siret 40857908400026)
Savoir-faire : Elaboration, transformation et commercialisation de produits en alliage de titane.
Direction : Monsieur Alain Soulié: Directeur Commercial
Monsieur Philippe Andrevon: Responsable Système d'Information Finances
Monsieur Jean-Marc Frisch: Président du Conseil d'Adm.
Madame Nicole Jordan: Responsable Adm. et Financier
Monsieur Jacques Carcey: Responsable Ress. Humaines
Mademoiselle Jessica Gregori: Secrétaire de dir.
Madame Marielle Elis: Responsable de la Formation
Monsieur Yvon Millet: Responsable Qualité

Créée en 1996 suite au rachat de l'activité titane de l'entreprise CEZUS par le groupe américain Titanium Metals Corporation, n°1 mondial, TIMET Savoie est le seul producteur Français de titane

- Une société de droit français 70 % TIMET et 30 % CEZUS
- Siège social et usine à Ugine
- Un effectif de 114 personnes (fin 2007)
- Un volume de production de 1 600 tonnes (2007)
- Un chiffre d'affaires de 97 millions d'€uros (2007)

Présence sur divers marchés :

- Aéronautique
- Médical
- Activités émergentes (automobile, architecture, sport, hi-tech, militaire hors aéronautique, pétrole et off-shore)



Activité de l'usine :

- Elaboration et transformation du titane et de ses alliages
- Fabrication de lingots, billettes, tubes et autres produits forgés
- Spécialiste dans la fabrication de billettes forgées en titane et alliage de titane de qualité aéronautique
- Un volume de 1 600 tonnes en 2007
- Plus de 90% de l'activité pour le secteur de l'aéronautique

Annexe 3 : Coordonnées des sociétés industrielles – AMF.

Société AMF

Route de Quincy
18120 Lury sur Arnon, France
Tel : 02 48 51 75 91
Fax : 02 48 51 70 38



Site officiel internet : <http://www.economie-cher.com/news/suite.asp?s=111>

La Société AMF a été créée initialement à Reuilly en 1998 par Philippe Marx, l'actuel gérant. Puis elle s'est implantée dans le Cher à Lury sur Arnon. Comme son nom l'indique, AMF est spécialisée dans les alliages à mémoire de forme. Société de métallurgie, sa vocation première est de fournir tous les distributeurs médicaux en agrafes à mémoire de forme et autres pièces à mémoire de forme.

AMF compte actuellement 6 personnes pour un chiffre d'affaires de 570 k€ en 2004.

Ses compétences vont de la fusion de l'alliage, à la pièce finie, en passant par les opérations métallurgiques classiques de laminage ou de tréfilage pour obtenir les demi-produits.

AMF ne vend pas de produits en direct aux hôpitaux, elle ne s'adresse qu'aux sociétés distributrices. Cela lui permet, en toute confidentialité, d'aider les distributeurs au développement de nouveaux produits.

Politique d'innovation :

Grâce aux compétences acquises par les alliages à mémoire de forme, AMF poursuit sa politique d'innovation afin de promouvoir les alliages à mémoire de forme, principalement dans les applications médicales. Tous ces développements vont dans le sens d'un plus grand service à tous ces clients médicaux :

- assistance au développement de nouveaux implants, en particulier de nouvelles agrafes à mémoire de forme,
- conception et réalisation d'une machine de fatigue.
- invention, développement et réalisation d'un nouveau type d'implant cardiovasculaire en partenariat avec l'hôpital Necker de Paris,
- invention, développement et réalisation d'un nouveau type d'implant rachidien pour réduire les scolioses. Projet soutenu par l'ANVAR.

Dans le Cher, un partenariat est en cours d'établissement avec le CRITT de Vierzon. AMF est lauréate du concours Cyberry 2004 destiné aux entreprises innovantes organisé par le Conseil général du Cher et l'Agence de développement du Cher avec un premier prix dans la catégorie Produits et services aux entreprises.

BUREAU VERITAS
Certification



Certification

Attribuée à

TIMET SAVOIE
62, avenue Paul Girod
73400 UGINE
FRANCE

Bureau Veritas Certification certifie que l'évaluation a été réalisée en conformité avec les règles relatives à la certification des systèmes qualité des fournisseurs de l'industrie aérospatiale EN9104 édition Décembre 2004 :

Standard

AS 9100 Revision B : 2004 / JIS Q 9100 : 2004
EN 9100 : 2003

Domaine d'activité

**ELABORATION ET TRANSFORMATION DU TITANE ET DE SES ALLIAGES,
DISTRIBUTION DES SEMI-PRODUITS EN TITANE.**

**MANUFACTURING OF TITANIUM AND OF TITANIUM ALLOYS,
SEMI-FINISHED TITANIUM PRODUCTS DISTRIBUTION.**

Date de certification originale : 10 Novembre 2003

Sous réserve du fonctionnement correct et satisfaisant du Système de Management de la Qualité de l'entreprise, ce certificat est valable jusqu'au **05 Octobre 2009**

Pour vérifier la validité du certificat appeler le 02 20 20 17 50 ou 01 39 99 75 00 33 00

Tout énoncé sur ce certificat ne peut être cité sans l'approbation écrite de l'entreprise certifiée.

Date : 04 Décembre 2006
Numéro d'affaire : 1.6° 4.300

Jean-Claude BOURGEOIS
Président

IA.O.G.



Annexe 4 : Certificats de conformité – Timet Savoie.



Titanium Metals Corporation
100 Titanium Way, Toronto, Ohio 43961
Telephone (740) 537-5694 FAX (740) 537-5753

APPROVED CERTIFICATE

PAGE 1 OF 2

CERTIFICATE ID
R7976--
HEAT
R7976

CUSTOMER
TIMET-UK
GRADE
TIMETAL 50A

PURCHASE ORDER
5P70430/EX587 C-1
PRODUCT DESCRIPTION
.047" STRIP 1/2

SPECIFICATIONS

AMS 4902 F; BS Z248 AMEND 2; DIN 17860 (11/90); MIL-T-9046 J, CP-3;
WL 3.7034 REIL 1 5/79

CHEMICAL ANALYSIS
(Weight Percent)

	C	Fe	N	O
R7976-AVG	0.015	0.100	0.009	0.088

	H2 (ppm)	LOCATION	METHOD
R7976---W1580-F	18	FRONT	HOT EXT.
R7976---W1580-B	24	BACK	HOT EXT.

Balance titanium

MECHANICAL PROPERTIES

EXAMINE GRAIN SIZE PER ASTM E 112

Grain Size Results

IDENTITY	GRAIN SIZE
R7976---W1580-F	10-0
R7976---W1580-B	9-0

QMA 3 - 2 MIN @ 1150°F

Room Temperature Tensile Results

IDENTITY	TENSILE	T	YSD	YS F01	YS F02	4D, % EL	SD, % EL
	DIR			0.24	1.04		
R7976---W1580-F	L	65	43	44	30	42.0	
R7976---W1580-B	L	69	47	49	29	42.0	

QMA 3 - 2 MIN @ 1100°F

Room Temperature Tensile Results

IDENTITY	TENSILE	T	YSD	YS F01	YS F02	4D, % EL	SD, % EL
	DIR			0.24	1.04		
R7976---W1580-F	T	64	52	53	29	46.0	
R7976---W1580-B	T	69	54	55	27	44.0	

VICKERS HARDNESS

Hardness HV (per ASTM E184)

IDENTITY	AVERAGE
R7976---W1580-F	239
R7976---W1580-B	164



First in Titanium Worldwide

Annexe 4 : Certificats de conformité – Timet Savoie.



Titanium Metals Corporation
 100 Titanium Way, Toronto, Ohio 43984
 Telephone (740) 537-5694, FAX (740) 537-5759

APPROVED CERTIFICATE

PAGE 2 OF 2

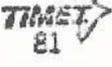
CERTIFICATE ID	CUSTOMER	PURCHASE ORDER
R7976--	TIMET-ME	SE70420/EX507 C-1
HEAT	GRADE	PRODUCT DESCRIPTION
R7976	TIMETAL 50A	.0475 STRIP

COMPLIANCE STATEMENTS

1. TIMET Toronto has established a quality management system that is in compliance with ISO 9002 and Q9002; certificate # 1033, through American Quality Assurance Registration ends November 10, 1998.
2. APPROVED CERTIFICATE SERIAL NO. 2473, ISSUED UNDER CIVIL AVIATION AUTHORITY, APPROVAL NO. AT 8836/83. CERTIFIED THAT UNLESS OTHERWISE STATED ABOVE, THE WHOLE OF THE ABOVE MENTIONED MATERIALS HAVE BEEN:
3. MANUFACTURED, TESTED AND INSPECTED IN ACCORDANCE WITH THE TERMS OF THE CONTRACT/ORDER APPLICABLE THEREIN AND CONFORM FULLY TO THE STANDARD/SPECIFICATIONS QUOTED HEREON AND THE REQUIREMENTS OF THE CIVIL AVIATION AUTHORITY.
4. SAE/AM/1064 DQL approval applies.
5. Material has been processed in accordance with the quality system per AS QQC 100 Issue 6.
6. Westland Group Approval Q/1061 applies.
7. Quality Assurance requirements per ASQ B101001.
8. Material complies with IN 9000 102.91.
9. Material and certificate in compliance with AS9100, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, 12.1, 12.2, 12.3, 12.4, 12.5, 12.6, 12.7, 12.8, 12.9, 13.1, 13.2, 13.3, 13.4, 13.5, 13.6, 13.7, 13.8, 13.9, 14.1, 14.2, 14.3, 14.4, 14.5, 14.6, 14.7, 14.8, 14.9, 15.1, 15.2, 15.3, 15.4, 15.5, 15.6, 15.7, 15.8, 15.9, 16.1, 16.2, 16.3, 16.4, 16.5, 16.6, 16.7, 16.8, 16.9, 17.1, 17.2, 17.3, 17.4, 17.5, 17.6, 17.7, 17.8, 17.9, 18.1, 18.2, 18.3, 18.4, 18.5, 18.6, 18.7, 18.8, 18.9, 19.1, 19.2, 19.3, 19.4, 19.5, 19.6, 19.7, 19.8, 19.9, 20.1, 20.2, 20.3, 20.4, 20.5, 20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 21.1, 21.2, 21.3, 21.4, 21.5, 21.6, 21.7, 21.8, 21.9, 22.1, 22.2, 22.3, 22.4, 22.5, 22.6, 22.7, 22.8, 22.9, 23.1, 23.2, 23.3, 23.4, 23.5, 23.6, 23.7, 23.8, 23.9, 24.1, 24.2, 24.3, 24.4, 24.5, 24.6, 24.7, 24.8, 24.9, 25.1, 25.2, 25.3, 25.4, 25.5, 25.6, 25.7, 25.8, 25.9, 26.1, 26.2, 26.3, 26.4, 26.5, 26.6, 26.7, 26.8, 26.9, 27.1, 27.2, 27.3, 27.4, 27.5, 27.6, 27.7, 27.8, 27.9, 28.1, 28.2, 28.3, 28.4, 28.5, 28.6, 28.7, 28.8, 28.9, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9, 30.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 30.8, 30.9, 31.1, 31.2, 31.3, 31.4, 31.5, 31.6, 31.7, 31.8, 31.9, 32.1, 32.2, 32.3, 32.4, 32.5, 32.6, 32.7, 32.8, 32.9, 33.1, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 33.9, 34.1, 34.2, 34.3, 34.4, 34.5, 34.6, 34.7, 34.8, 34.9, 35.1, 35.2, 35.3, 35.4, 35.5, 35.6, 35.7, 35.8, 35.9, 36.1, 36.2, 36.3, 36.4, 36.5, 36.6, 36.7, 36.8, 36.9, 37.1, 37.2, 37.3, 37.4, 37.5, 37.6, 37.7, 37.8, 37.9, 38.1, 38.2, 38.3, 38.4, 38.5, 38.6, 38.7, 38.8, 38.9, 39.1, 39.2, 39.3, 39.4, 39.5, 39.6, 39.7, 39.8, 39.9, 40.1, 40.2, 40.3, 40.4, 40.5, 40.6, 40.7, 40.8, 40.9, 41.1, 41.2, 41.3, 41.4, 41.5, 41.6, 41.7, 41.8, 41.9, 42.1, 42.2, 42.3, 42.4, 42.5, 42.6, 42.7, 42.8, 42.9, 43.1, 43.2, 43.3, 43.4, 43.5, 43.6, 43.7, 43.8, 43.9, 44.1, 44.2, 44.3, 44.4, 44.5, 44.6, 44.7, 44.8, 44.9, 45.1, 45.2, 45.3, 45.4, 45.5, 45.6, 45.7, 45.8, 45.9, 46.1, 46.2, 46.3, 46.4, 46.5, 46.6, 46.7, 46.8, 46.9, 47.1, 47.2, 47.3, 47.4, 47.5, 47.6, 47.7, 47.8, 47.9, 48.1, 48.2, 48.3, 48.4, 48.5, 48.6, 48.7, 48.8, 48.9, 49.1, 49.2, 49.3, 49.4, 49.5, 49.6, 49.7, 49.8, 49.9, 50.1, 50.2, 50.3, 50.4, 50.5, 50.6, 50.7, 50.8, 50.9, 51.1, 51.2, 51.3, 51.4, 51.5, 51.6, 51.7, 51.8, 51.9, 52.1, 52.2, 52.3, 52.4, 52.5, 52.6, 52.7, 52.8, 52.9, 53.1, 53.2, 53.3, 53.4, 53.5, 53.6, 53.7, 53.8, 53.9, 54.1, 54.2, 54.3, 54.4, 54.5, 54.6, 54.7, 54.8, 54.9, 55.1, 55.2, 55.3, 55.4, 55.5, 55.6, 55.7, 55.8, 55.9, 56.1, 56.2, 56.3, 56.4, 56.5, 56.6, 56.7, 56.8, 56.9, 57.1, 57.2, 57.3, 57.4, 57.5, 57.6, 57.7, 57.8, 57.9, 58.1, 58.2, 58.3, 58.4, 58.5, 58.6, 58.7, 58.8, 58.9, 59.1, 59.2, 59.3, 59.4, 59.5, 59.6, 59.7, 59.8, 59.9, 60.1, 60.2, 60.3, 60.4, 60.5, 60.6, 60.7, 60.8, 60.9, 61.1, 61.2, 61.3, 61.4, 61.5, 61.6, 61.7, 61.8, 61.9, 62.1, 62.2, 62.3, 62.4, 62.5, 62.6, 62.7, 62.8, 62.9, 63.1, 63.2, 63.3, 63.4, 63.5, 63.6, 63.7, 63.8, 63.9, 64.1, 64.2, 64.3, 64.4, 64.5, 64.6, 64.7, 64.8, 64.9, 65.1, 65.2, 65.3, 65.4, 65.5, 65.6, 65.7, 65.8, 65.9, 66.1, 66.2, 66.3, 66.4, 66.5, 66.6, 66.7, 66.8, 66.9, 67.1, 67.2, 67.3, 67.4, 67.5, 67.6, 67.7, 67.8, 67.9, 68.1, 68.2, 68.3, 68.4, 68.5, 68.6, 68.7, 68.8, 68.9, 69.1, 69.2, 69.3, 69.4, 69.5, 69.6, 69.7, 69.8, 69.9, 70.1, 70.2, 70.3, 70.4, 70.5, 70.6, 70.7, 70.8, 70.9, 71.1, 71.2, 71.3, 71.4, 71.5, 71.6, 71.7, 71.8, 71.9, 72.1, 72.2, 72.3, 72.4, 72.5, 72.6, 72.7, 72.8, 72.9, 73.1, 73.2, 73.3, 73.4, 73.5, 73.6, 73.7, 73.8, 73.9, 74.1, 74.2, 74.3, 74.4, 74.5, 74.6, 74.7, 74.8, 74.9, 75.1, 75.2, 75.3, 75.4, 75.5, 75.6, 75.7, 75.8, 75.9, 76.1, 76.2, 76.3, 76.4, 76.5, 76.6, 76.7, 76.8, 76.9, 77.1, 77.2, 77.3, 77.4, 77.5, 77.6, 77.7, 77.8, 77.9, 78.1, 78.2, 78.3, 78.4, 78.5, 78.6, 78.7, 78.8, 78.9, 79.1, 79.2, 79.3, 79.4, 79.5, 79.6, 79.7, 79.8, 79.9, 80.1, 80.2, 80.3, 80.4, 80.5, 80.6, 80.7, 80.8, 80.9, 81.1, 81.2, 81.3, 81.4, 81.5, 81.6, 81.7, 81.8, 81.9, 82.1, 82.2, 82.3, 82.4, 82.5, 82.6, 82.7, 82.8, 82.9, 83.1, 83.2, 83.3, 83.4, 83.5, 83.6, 83.7, 83.8, 83.9, 84.1, 84.2, 84.3, 84.4, 84.5, 84.6, 84.7, 84.8, 84.9, 85.1, 85.2, 85.3, 85.4, 85.5, 85.6, 85.7, 85.8, 85.9, 86.1, 86.2, 86.3, 86.4, 86.5, 86.6, 86.7, 86.8, 86.9, 87.1, 87.2, 87.3, 87.4, 87.5, 87.6, 87.7, 87.8, 87.9, 88.1, 88.2, 88.3, 88.4, 88.5, 88.6, 88.7, 88.8, 88.9, 89.1, 89.2, 89.3, 89.4, 89.5, 89.6, 89.7, 89.8, 89.9, 90.1, 90.2, 90.3, 90.4, 90.5, 90.6, 90.7, 90.8, 90.9, 91.1, 91.2, 91.3, 91.4, 91.5, 91.6, 91.7, 91.8, 91.9, 92.1, 92.2, 92.3, 92.4, 92.5, 92.6, 92.7, 92.8, 92.9, 93.1, 93.2, 93.3, 93.4, 93.5, 93.6, 93.7, 93.8, 93.9, 94.1, 94.2, 94.3, 94.4, 94.5, 94.6, 94.7, 94.8, 94.9, 95.1, 95.2, 95.3, 95.4, 95.5, 95.6, 95.7, 95.8, 95.9, 96.1, 96.2, 96.3, 96.4, 96.5, 96.6, 96.7, 96.8, 96.9, 97.1, 97.2, 97.3, 97.4, 97.5, 97.6, 97.7, 97.8, 97.9, 98.1, 98.2, 98.3, 98.4, 98.5, 98.6, 98.7, 98.8, 98.9, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9, 100.1, 100.2, 100.3, 100.4, 100.5, 100.6, 100.7, 100.8, 100.9.
10. 180 degree bend test performed and is acceptable. Bend factor P-T 1.0 examined at 10X.
11. 180 degree bend test performed and is acceptable. Bend factor P-T 1.5 examined at 10X.

Records are from TIMET Quality Control records on file.
 Cert Mastes used: STR50A-J

Date : 11-09-1998
 Time : 16:01



 Authorized Signature



Annexe 4 : Certificats de conformité – AMF.

ASCI
ASSOCIATION
CERTIFICAT

Nous certifions que le système qualité réellement mis en œuvre par la Société

A.M.F.

relatif aux activités de
**FABRICATION DE PIÈCES À MÉMOIRE DE FORME
ET AUTRES ALLIAGES. RÉALISATION D'ESSAIS MÉCANIQUES
ET D'ESSAIS DE FATIGUE.**

réalisées à
LURY-SUR-ARNON (CHER) FRANCE

a été jugé cohérent avec les exigences de la norme homologuée

NF EN ISO 9001:2000

(Identique aux ISO 9001:2000, DIN EN ISO 9001:2000, BS EN ISO 9001:2000)

et avec la politique qualité formulée.

Le certificat initial date du 16 novembre 2000

Le Représentant de la Direction
est le gérant de l'Entreprise

Le Gérant de l'Entreprise certifiée
Monsieur Philippe MARN

Tel : 03 75 24 74 20
Site : www.asci-qualite.com

cofrac



ACCREDITATION
N° 4-016756

Ce certificat N° 2000-XC est valable selon le contrat associé, jusqu'au 15.05.2010.

www.cofrac.com

15 rue de la Courbe de l'Éclaircie - 69003 LYON

Lyon, le 31 mai 2007

H. Henrich

Le Président du Comité de Certification

Page 1 sur 1

Annexe 5 : Références commerciales des produits utilisés

Produits	Références	Désignation
EDC	SIGMA E7750	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide sodium salt
NHS	FLUKA 56485	N-Hydroxy-Sulfosuccinimide sodium salt >98,5%
PEI	ALDRICH 18,197-8	Poly-Ethylene-Imine 50 wt% solution in water
PAH	ALDRICH 28,322-3	Poly-Allylamine-Hydrochloride
PSS	ALDRICH 24,305-1	Poly-Sodium4-Styrene-Sulfonate
PLL	SIGMA P7890	Poly-L-Lysine Hydrobromide mol wt 15000-30000
PLL- FITC	SIGMA P3069	Poly-L-Lysine -FITC labeled mol wt 30000-70000
HA	BIOIBERICA, Spain	Hyaluronan Acid
Diiodométhane	ALDRICH 15,842-9	Diiodométhane 99%
Formamide	SIGMA F5786	Formamide min 99%

Céline BRUNOT-GOHIN

OPTIMISATION DES ETATS DE SURFACE DU TITANE ET DES ALLIAGES EN NICKEL-TITANE PAR DES FILMS MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES.

155 pages, 243 références bibliographiques.

Résumé : L'optimisation des états de surface constitue un enjeu majeur pour les biomatériaux utilisés dans le domaine biomédical. Le titane (Ti) et ses alliages à base de nickel (NiTi) restent à ce jour les biomatériaux métalliques de prédilection dans nos applications cliniques en Odontologie (Implants dentaires, instruments endodontiques, et arcs orthodontiques).

Le but de nos recherches est d'optimiser les surfaces du Ti et du NiTi en les fonctionnalisant par des films multicouches de polyélectrolytes (FMP). Notre travail propose d'étudier différents paramètres devant être impérativement validés avant d'envisager une quelconque application biomédicale *in vivo* avec ce type de revêtement. Une recherche bibliographique exhaustive appuie notre recherche expérimentale.

Le premier axe du travail propose de déterminer si des FMP peuvent effectivement s'adsorber chimiquement sur le Ti et le NiTi. Qui plus est, une étude biologique est réalisée avec des cellules humaines pour tester la biocompatibilité de ces surfaces fonctionnalisées. La deuxième partie se concentre sur la biocompatibilité de la couche précurseur des FMP à base de polyéthylèneimine (PEI). Les résultats mettent en lumière une certaine cytotoxicité de la PEI en vers des ostéoblastes et des fibroblastes gingivaux humains. Pour clore ce travail, nous réalisons des essais de stérilisation afin d'évaluer l'influence d'un tel procédé sur les FMP en terme de caractérisations physico-chimique et biologique des surfaces.

La perspective d'une application biomédicale avec les FMP semble prometteuse, notamment en y introduisant des molécules bioactives. Cependant, bien d'autres paramètres sont encore à étudier avant d'envisager une application expérimentale et/ou clinique *in vivo*. Nous pouvons citer par exemple, le vieillissement des FMP, leur comportement en milieu salivaire ou fluoré, ou encore leur résistance à l'usure. Ces différents éléments rentrent dans les perspectives d'un projet post-doctoral.

Mots clés : Titane (Ti), alliage en nickel-titane (NiTi), films multicouches de polyélectrolytes, rugosité de surface, propriétés physico-chimiques des surfaces, stérilisation, fibroblastes et ostéoblastes humains, culture cellulaire.

SURFACES OPTIMIZATION OF TITANIUM AND NICKEL-TITANIUM ALLOYS COATED WITH POLYELECTROLYTES MULTILAYERS FILMS

Abstract: Optimization of surface properties is a fundamental priority for biomaterials used in biomedical applications. Titanium (Ti) and nickel-titanium alloys (NiTi) are the references in terms of metallic biomaterials for clinical applications in Odontology (Dental implants, endodontic instrumentations, and orthodontic arches).

The aim of our work is to study the Ti and NiTi surfaces coated with polyelectrolytes multilayers films (PEM). Our work study various parameters needed to be validated before using this functionalized surface treatment for biomedical and clinical applications *in vivo*.

The first part of this work aims at defining the possibility to chemically adsorb PEM coating on Ti and on NiTi surfaces. Moreover, we have realized a biological study with human cells to test the biocompatibility of functionalized surfaces. In the second part of this thesis, we tested the biocompatibility of the multilayered structure in regards to the precursor base layer of PEM, the polyethyleneimine (PEI). Our results show that the PEI is not cytotoxic towards osteoblasts and human gingival fibroblasts. Finally, we realized tests of sterilization to evaluate PEM stability in terms of physico-chemical and biological surface characterizations.

The development of specific biomedical applications for PEM is an exciting perspective, especially when these films are functionalized with bioactive molecules. However, many other parameters must be studied before imagining an experimental or clinical application *in vivo*. As an example, PEM degradation as well as behaviour in salivary or fluoride solution, still needs to be tested.

Keywords (Mesh) : Titanium (Ti), nickel-titanium alloys (NiTi), multilayer polyelectrolytes films, surface roughness, physico-chemical surface properties, sterilization, human fibroblasts and osteoblasts, cell culture.

Jury :	Monsieur le Professeur Christophe EGLES	Rapporteur
	Monsieur le Professeur Pierre FARGE	Examineur
	Madame le Docteur Brigitte GROSGOGEAT	Directeur
	Madame le Professeur Dominique LAURENT-MAQUIN	Examineur
	Monsieur le Professeur Philippe MIELE	Examineur
	Madame le Professeur Laurence MORA-PONSONNET	Co-Directeur
	Madame le Professeur Catherine PICART	Examineur
	Monsieur le Professeur Pierre WEISS	Rapporteur

Discipline : Odontologie, Ingénierie cellulaire et tissulaire

Adresse de l'auteur : 80 Place Drouet d'Erlon, 51100 Reims.

Adresses des laboratoires :

Laboratoire Multimatériaux et Interfaces (LMI),
UMR 5615, Equipe Biomateriaux et Interfaces Biologiques,
Faculté d'Odontologie, Rue Guillaume Paradin

Laboratoire de Bio-Ingénierie de Polymères Cardiovasculaires LBIPC,
INSERM U 698, Bureau E 119, Institut Galilée, Université Paris 13,
99 avenue JB Clément.

