



Influence du procédé de mise en forme additif sur les propriétés mécaniques et biologiques d'un alliage de titane, pour une application prothétique supra-implantaire en odontologie

Marie-Joséphine Crenn

► To cite this version:

Marie-Joséphine Crenn. Influence du procédé de mise en forme additif sur les propriétés mécaniques et biologiques d'un alliage de titane, pour une application prothétique supra-implantaire en odontologie. Santé. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2022. Français. NNT : 2022PA131015 . tel-03956370

HAL Id: tel-03956370

<https://theses.hal.science/tel-03956370>

Submitted on 25 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS XIII –SORBONNE PARIS NORD

École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

**Influence du procédé de mise en forme additif sur les propriétés mécaniques
et biologiques d'un alliage de titane, pour une application prothétique supra-
implantaire en odontologie.**

THÈSE DE DOCTORAT
présentée par

Marie-Joséphine Crenn

Laboratoire UR 4462 Biomatériaux Innovants et Interfaces (URB2i)

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DES MATERIAUX.

soutenue le 29 Mars 2022 devant le jury d'examen constitué de :

NOM Prénom, établissement, Présidente / Président du jury

NOM Prénom, établissement, Rapporteur / Rapportrice

NOM Prénom, établissement, Rapporteur / Rapportrice

NOM Prénom, établissement, Examineur / Examinatrice

NOM Prénom, établissement, Examineur / Examinatrice

ATTAL Jean-Pierre, établissement, Directeur de thèse

NOM Prénom, établissement, Co-directeur / Co-directrice de thèse

Ad augusta, per angusta.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION GENERALE	4
LES PIECES PROTHETIQUES IMPLANTO-PORTEES	6
1 Définitions et terminologie	6
2 Rôles	8
3 Choix du titane	9
4 Fabrication.....	10
5 Problématique	12
CHAPITRE 1. INFLUENCE DU PROCEDE SLM SUR LES PROPRIETES MECANQUES D'UN ALLIAGE DE TITANE	14
I-1 Fusion sélective par laser (<i>Selective Laser Melting</i>)	14
I-1-1 Quelques généralités sur le procédé	14
I-1-2 Paramètres de fabrication	15
I-2 Propriétés générales des pièces en alliages TiAl64V élaborées par SLM	16
I-2-1 Rugosités des pièces.....	18
I-2-2 Porosités dans les pièces	18
I-2-3 Particularités microstructurales	19
I-3 Propriétés mécaniques en traction du titane Ti6Al4V fabriqués par SLM.....	21
I-4 Synthèse & limites	24
CHAPITRE 2. INFLUENCE DU PROCEDE SLM SUR LA REPONSE BIOLOGIQUE DES CELLULES GINGIVALES.....	27
II-1 L'importance de la partie transgingivale en prothèse implanto-portée.....	27
II-2 Influence du procédé SLM sur la réponse des cellules gingivales fibroblastiques	29
II-3 Synthèse et <i>supplementary data</i>	37
II-4 L'optimisation de l'état de surface du composant transgingival	38
CHAPITRE 3. MODIFICATION ELECTROCHIMIQUE DE LA SURFACE D'UN ALLIAGE DE TITANE OBTENU PAR SLM	41
III-1 L'anodisation : Principes et paramètres.....	41
III-1-1 Description du procédé.....	42
III-1-2 Mécanisme de formation des NT	42
III-1-3 Les facteurs influençant la morphologie/croissance des NT/NP.....	44
La durée d'anodisation.....	45
La tension d'anodisation	45
La composition de l'électrolyte	46
III-2 Revue de la littérature : « Influence des surfaces anodisées sur le comportement des cellules gingivales : revue systématique d'études <i>in vitro</i> »	47
III-3 Nano-structuration d'une surface de titane obtenue par LBM : Synthèse puis caractérisation morphologique & physico-chimique	70
III-3-1 Caractérisation de la morphologie des nanotubes sur une surface de Ti6Al4V obtenue par SLM...72	72
III-3-1-1 Préparation des échantillons	72
III-3-1-2 Protocole expérimental et moyens d'analyse des échantillons.....	74
III-3-1-3 Résultats de la caractérisation morphologique et discussion.....	77
- Influence de la microstructure sur la morphologie des NT	79
- Influence de la tension d'anodisation sur la morphologie des NT	80
- Influence de l'orientation cristallographique sur la morphologie des NT	82
III-3-1-4 Synthèse	85
III-3-2 Caractérisation de la chimie de surface des échantillons anodisées.....	85
III-3-2-1 Protocole expérimental	85
III-3-2-2 Résultats de l'analyse XPS & discussion.....	88
III-3-2-3 Résultats de l'analyse IRAAS & discussion.....	99
III-3-2-4 Synthèse	105
CONCLUSION, LIMITES ET PERSPECTIVES.....	107
BIBLIOGRAPHIE	110

TABLE DES ILLUSTRATIONS	115
Figures.....	115
Tableaux.....	118
FICHES ANNEXES	119

Liste des abréviations

La liste suivante regroupe par ordre alphabétique, les abréviations présentes dans le manuscrit. Les acronymes ou abréviations contenus dans les articles, sont explicités dans la publication respective.

ANOVA : Analyse de la variance

ASTM : *American Society for Testing and Materials*

CAO : Conception Assistée par Ordinateur

DRX : Diffraction des rayons X

EBS : *Electron Back Scattered Diffraction* ou Diffraction d'électrons rétrodiffusés

FA : Fabrication additive

FAO : Fabrication assistée par ordinateur

HD : Hemidesmosome

HF : Acide fluorhydrique

HNO₃ : Acide nitrique

h ν : Energie du rayon incident

ISO : International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation)

IRRAS : Infrared Reflection Adsorption Spectroscopy

LBM : *Laser Beam Melting*

L-PBF : *Laser Powder Bed Fusion*

MEB : Microscope électronique à balayage

NaF : Fluorure de sodium

NH₄F : Fluorure d'ammonium

NP : Nanopore

NT : Nanotube

PPIP : Pièce prothétiques implanto-portées

PZC : Point isoélectrique

SLM : *Selective Laser Melting* ou Fusion Sélective par Laser

TiO₂ : Dioxyde de titane

Ti6Al4V : Alliage de titane composé de 6% Aluminium et 4% Vanadium

US : Ultra-sons

XPS : Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X

Introduction générale

Le procédé additif de **fusion laser sélective** (ou SLM) consiste à élaborer des pièces métalliques par ajout de matière. En garantissant la réalisation de pièces à géométries complexes, il permet notamment la réalisation de dispositifs médicaux sur mesure dont font partie les pièces prothétiques en odontologie.

Dans le cadre particulier des pièces **prothétiques implanto-portées en alliage de titane**, l'apparition récente des procédés hybrides associant cette technique additive à l'usinage représente aujourd'hui une alternative fiable aux techniques conventionnelles. Ce procédé ouvre ainsi la voie à de nouveaux modèles économiques en proposant également une diminution des pertes de matière lors de la mise en forme de ces pièces.

Néanmoins, avant d'insérer dans la cavité buccale ces dispositifs, il s'avère pertinent de vérifier dans quelles mesures ce nouveau procédé de fabrication pourrait influencer le comportement de ces pièces. En effet, en raison de caractéristiques inhérentes à la technique de fabrication, comme les fortes vitesses de refroidissement ou l'assemblage par couches, les pièces ainsi produites présentent des propriétés différentes de celles des pièces traditionnellement obtenues par soustraction à partir d'un bloc de titane.

Dans le cadre de la réglementation concernant les dispositifs médicaux sur mesure, les pièces prothétiques non standardisées, personnalisées par CAO pour une situation cas clinique donnée sont un cas à part en termes de réglementation. L'évaluation des performances de ces dispositifs mis en forme spécifiquement par ces procédés additifs est indispensable avant d'envisager leur utilisation en bouche. Il est notamment impératif que ces composants respectent non seulement des critères mécaniques suffisants afin par exemple de supporter les contraintes auxquelles ils seront soumis pendant les cycles de mastication, mais également qu'ils aient un comportement biologique favorable au contact des tissus gingivaux permettant ainsi l'intégration tissulaire de leurs parties transgingivales.

Ainsi, **l'objectif principal de ce travail est d'évaluer les propriétés mécaniques et biologiques des pièces en Ti6Al4V obtenues par SLM**. L'idée sous-jacente est de permettre, pour les acteurs de santé dans le domaine de l'odontologie, une meilleure compréhension du procédé dans son ensemble et surtout une meilleure connaissance des propriétés inhérentes aux pièces obtenues. Enfin, dans le but d'améliorer la bioactivité d'une surface mise en forme par SLM, **l'objectif secondaire de ce travail est la synthèse et la caractérisation d'une surface de Ti6Al4V nanostructurée par oxydation anodique**.

Ce travail de thèse est construit en trois parties qui ont chacune fait l'objet d'une publication internationale dans des journaux indexés. Après une présentation des pièces prothétiques implanto-portées, **le premier chapitre** décrit d'abord le procédé additif de fusion sur lit de poudre et les principaux paramètres qui lui sont associés. Ensuite, les propriétés mécaniques d'un alliage de titane (Ti6Al4V) de grade 23 ELI mis en forme par SLM sont étudiées et comparées à un alliage similaire de Ti6Al4V de grade 5, obtenu par usinage, et traditionnellement utilisé pour la mise en forme de PPIP.

Le **deuxième chapitre** a pour but d'analyser la réponse cellulaire *in vitro* de cellules fibroblastiques au contact direct de surfaces mises en œuvre par SLM. Dans le prolongement

logique de cette partie consacrée à la dimension biologique, **le dernier chapitre** permet d'amorcer de nouvelles perspectives en proposant de modifier par anodisation ces nouvelles surfaces de Ti6Al4V. Dans un premier temps, une revue systématique de la littérature sera présentée pour comprendre l'influence des surfaces anodisées sur le comportement des cellules gingivales à travers une synthèse exhaustive des études *in vitro* publiées ces dix dernières années. Dans un deuxième temps, la caractérisation morphologique d'une surface de Ti6Al4V obtenue par SLM et modifiée par anodisation sera présentée pour comprendre comment les particularités des surfaces SLM peuvent influencer les surfaces de Ti6Al4V anodisées. Enfin, dans l'optique d'enrichir la réflexion sur la réactivité des surfaces nanotubulaires créées par anodisation, une caractérisation chimique des surfaces viendra clôturer ce travail.

Mots clés en Français : Prosthodontie ; Prothèses dentaires ; Fusion sur lit de poudre ; Ti6Al4V ELI; Cytotoxicité ; Fibroblastes gingivaux ; Modification de Surface ; Anodisation ; Réactivité de surface.

Mots clés en Anglais : *Additive Manufacturing; Prosthodontics; Dental prosthesis, Selective Laser Melting; Ti6Al4V ELI; Surface topography; Biocompatibility; Gingival fibroblasts; Surface Modification; Anodization; Surface reactivity.*

Les pièces prothétiques implanto-portées

1 Définitions et terminologie

Les **pièces prothétiques implanto-portées (PPIP)** peuvent être définies comme l'ensemble des pièces (ou accastillage) nécessaires à la conception et à la réalisation d'une restauration prothétique dentaire prenant ancrage dans un ou plusieurs implant(s).

Toutes ces pièces prothétiques servent de **moyen de liaison** entre le ou les implant(s) et le matériau cosmétique qui construit la couronne dentaire artificielle. C'est l'association de ces pièces prothétiques supra-implantaires et du matériau cosmétique qui constitue la restauration finale implanto-portée.

Ces pièces prothétiques implanto-portées sont d'apparition récentes parmi l'ensemble des pièces prothétiques quand on les compare aux pièces prothétiques utilisées en prothèse dento-portées, puisqu'elles ont été progressivement développées ces 20 dernières années en parallèle de la thérapeutique implantaire chirurgicale (1). Elles n'ont eu cesse alors de subir de nombreuses évolutions concernant leurs architectures. Selon leur *design* et selon leurs morphologies caractéristiques, elles peuvent être désignées sous différentes appellations. S'il existe un lexique consensuel en termes de vocabulaires pour définir le matériel implantaire et les procédures cliniques qui en découlent (ISO 16443 :2014) (2), il est en revanche bien plus difficile de trouver un vocabulaire uniforme standardisé en rapport avec la prothèse implanto-portée et plus spécifiquement l'accastillage supra-implantaire.

On retrouve ainsi plusieurs termes : **le pilier** (quand la pièce supra-implantaire prend son ancrage à travers un implant unitaire), **la barre** (quand la pièce supra-implantaire relie plusieurs implants et adopte la forme d'une barre à hauteur réduite) et **l'armature** (quand la pièce supra-implantaire relie plusieurs implants et prend une forme particulière adaptée à la situation clinique). Si la pièce prothétique finale est composée de 2 étages distincts, alors les éléments qui constituent l'étage le plus proche de l'implant sont désignés par le nom d'**infrastructure**, et ceux qui constituent l'étage supérieur sont retrouvés sous le terme de **suprastructures**. C'est par exemple le cas quand plusieurs piliers supportent une armature transvissée : les piliers deviennent « l'infrastructure » et l'armature qui supporte la céramique : la suprastructure. A noter que la barre est une armature mais toute armature n'est pas une barre. C'est au praticien de choisir le type de PPIP en fonction de la conception prothétique choisie, conception largement dépendante du contexte clinique. Les principaux critères qui interviennent sur la décision finale sont l'espace prothétique disponible, le nombre d'implants ainsi que leur position, axe et émergence, les dents résiduelles, les matériaux (propriétés et coût) et enfin le patient (âge et préférences).

La figure 1 présente différentes PPIP retrouvés dans les catalogues des fabricants.

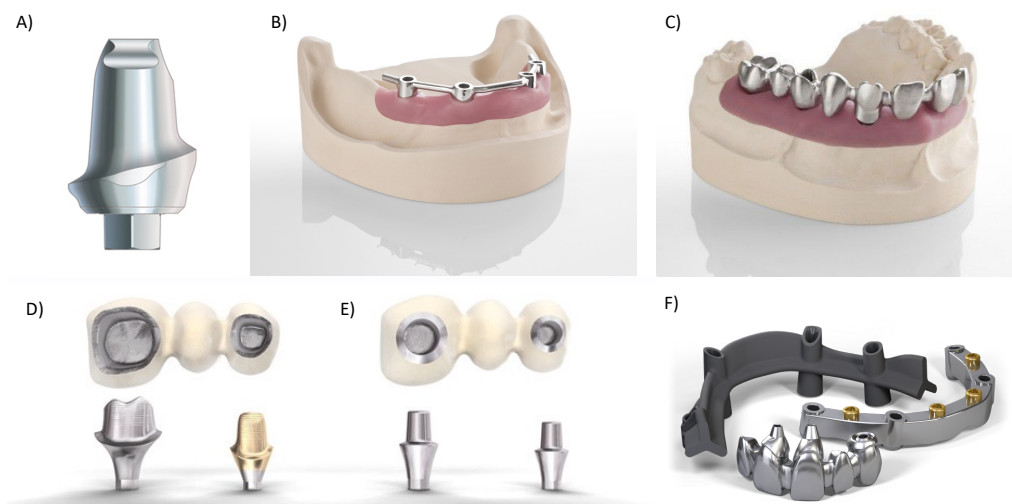


Figure 1 : Exemple de différents types de pièces prothétiques implanto portées. A) Pilier droit standard ; source : Zimmer. B) Exemple d'une barre à section ronde reliant 4 implants destinée à supporter une prothèse complète par l'intermédiaire de cavaliers ; source : Straumann. C) Exemple d'une armature destinée à supporter le matériau cosmétique ; source : Straumann. D) et E) : Exemple de 2 piliers supportant une armature de bridge. Les piliers constituent l'infrastructure et l'armature la suprastructure ; source : Dentsply Sirona. E) Exemple de différentes armatures et barres présentant des architectures variées ; source : Straumann.

En anglais, les termes les plus fréquemment retrouvés sont « *abutment* » pour pilier, « *framework* » pour armature, « *bar* » pour les barres, « *superstructures* » pour suprastructures, et parfois « *substructure* » pour infrastructure (3).

Ces pièces sont obligatoires pour toutes restaurations supra-implantaires, que l'on réalise de la prothèse implanto-portée de petite ou grande étendue fixe (transvissée ou scellée) ou amovible. Elles peuvent venir se positionner directement dans la connectique implantaire ou alors à travers une pièce intermédiaire appelée « piliers conique » considéré également comme faisant partie de l'arsenal prothétique. En général, pour les édentements unitaires ou de petite étendue avec des implants parallèles entre eux, les pièces supra-implantaires viennent prendre ancrage directement au niveau de l'implant. En revanche, si l'on souhaite solidariser plusieurs implants entre eux, par exemple dans le cas de réhabilitation complète d'une arcade, il faut alors le plus souvent recourir à ces piliers intermédiaires.

Ces PPIP présentent **2 caractéristiques morphologiques majeures** (Figure 2) qui les différencient des pièces prothétiques dento-dentées :

- Une partie de leur structure est destinée à venir s'insérer directement dans la connexion implantaire (ou dans un pilier intermédiaire) dénommé « **connectique** ».
- Une partie de leur structure est en contact direct avec la gencive, il s'agit de « **la partie transgingivale** ».

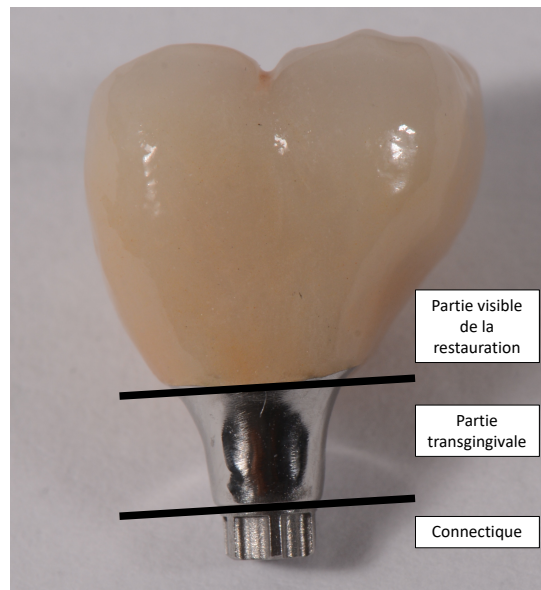


Figure 2 : Photographie représentant les 2 parties caractéristiques d'un pilier supra-implantaire ; source personnelle.

Ces PPIP, sont la plupart du temps spécifiquement conçues pour être adaptée à la situation clinique traitée. On dit qu'elles sont alors « **personnalisées** » au cas du patient. En effet, même s'il existe des piliers préfabriqués de forme standardisée que l'on trouve dans les catalogues des fabricants, ceux-ci ne conviennent pas toujours pour équiper un implant posé dans les conditions anatomiques propres au patient traité et ceci particulièrement en secteur esthétique. Il s'avère donc nécessaire de concevoir ces piliers par CAO et de les produire par FAO permettant ainsi la personnalisation de ces pièces. La production de piliers individualisés s'impose de plus en plus comme la modalité de référence pour les implants unitaires antérieurs (4) et c'est encore plus vrai quand il faut relier plusieurs implants ensemble, puisque chaque conception est unique.

Légalement ces pièces prothétiques implanto-portées personnalisées sont considérées comme des **dispositifs médicaux sur-mesure** qui doivent faire l'objet d'une prescription et d'une feuille de traçabilité.

2 Rôles

Ces composants ont plusieurs rôles :

- Ils servent de **moyens de liaison** entre la/les dents artificielles et l'implant
- Ils permettent la **réten**tion de la suprastructure
- Ils assurent également **la transmission des contraintes mécaniques développées** pendant la mastication et la déglutition, entre la face occlusale des dents prothétiques et l'implant sous-jacent.
- Ils assurent grâce au contact entre leur partie transgingivale et la gencive **une barrière contre la pénétration des bactéries** salivaires.

Afin de répondre à ces objectifs, ces pièces doivent être réalisées à partir d'un matériau, qui une fois mis en forme, présente des propriétés mécaniques et biologiques en accord avec l'application pour laquelle elles sont conçues.

Dans le cas de PPIP, ce matériau devrait idéalement répondre au cahier des charges suivant :

- Il doit être biocompatible et donc résistant à la corrosion et ne pas engendrer de produits de dégradation toxiques pour l'organisme.
- Il doit promouvoir un comportement positif des cellules gingivales à sa surface.
- Il doit présenter des propriétés mécaniques suffisantes afin de résister aux forces de compression, de traction, et de torsion exercées suivant des directions axiales et latérales, avec des variations d'amplitude et des pics de contrainte (5) et ceci dans des conditions statiques ou dynamiques.
- Il doit être facilement mis en œuvre par le technicien de laboratoire par un procédé reproductible et précis en termes de respect des cotes ainsi que de stabilité dimensionnelle.
- Il doit assurer la rétention du matériau cosmétique.
- Il doit être esthétique.
- Il doit faciliter l'hygiène quotidienne pour le patient.
- Il doit présenter un coût qui s'inscrit dans des soins qualitatifs tout en restant accessible à la majorité des patients.

Aucun matériau actuel ne répond complètement à l'ensemble de ces exigences. Le choix résulte alors d'un compromis qui se fait en fonction de plusieurs critères décisionnels cliniques : le nombre d'implants, la position de ceux-ci, le schéma occlusal du patient et le type de prothèse envisagée.

3 Choix du titane

Les PPIP sont depuis le début de l'implantologie principalement fabriqués à partir de matériaux métalliques et notamment des alliages de cobalt-chrome et des alliages de titane. Aujourd'hui l'interdiction des alliages de cobalt-chrome dans le domaine médical liée à la toxicité de l'ion cobalt place les alliages de titane en position maîtresse (6).

En effet, même si d'autres matériaux sont aujourd'hui proposés comme la zircone, les céramiques ou le polyétheréthércétone (PEEK) pour la réalisation de ces pièces implanto-portée, l'utilisation du **titane** et plus particulièrement du Ti6Al4V (grade 5) garantit un taux de succès excellent de la restauration supra-implantaire (qu'elle soit unitaire, plurale ou complète) mais surtout **un recul clinique significatif**. Cet excellent taux de succès s'explique par ses très bonnes propriétés mécaniques, sa résistance à la corrosion et la possibilité de produire des pièces supra-implantaires **en une seule partie**. Cette unicité permet non seulement une cohérence mécanique du système prothétique, mais également de l'ensemble implant-prothèse. En effet, dans le cas de l'utilisation de matériaux différents présentant une différence significative de module d'Young, il peut se créer, pour la même contrainte appliquée, une hétérogénéité de déformation au niveau des interfaces : le matériau avec le module d'Young le plus élevé se déforme le moins subissant alors des contraintes qui peuvent mener *in fine* à la fracture. Selon Brägger (5), le facteur de survie le plus important pour une restauration supra-implantaire, est la **stabilité des interfaces d'assemblage**. Chaque interface et combinaison de matériaux supplémentaires ajoutent des facteurs de risques. C'est le cas avec les piliers monolithiques en zircone qui présentent une faible résistance à la fracture (7). De plus, la

différence de dureté entre la zircone et le titane peut provoquer une usure de la connectique implantaire en titane aboutissant à des micromouvements néfastes à long terme (8,9).

Évidemment, ce raisonnement est simplifié : en pratique, en fonction de l'orientation des forces et de leur intensité, l'association de plusieurs matériaux peut être envisagée sous réserve de privilégier un contact titane-titane au niveau de la connectique. Par exemple, l'association d'une embase en titane sur laquelle une pièce en zircone est agrégée par collage, connues sous le nom de pilier TiBase® est une solution qui semble être fiable dans les secteurs antérieurs avec un taux de succès rapporté d'environ 92.4 % à 2 ans (10). En revanche, le taux de succès de ce type de dispositifs semble être sensible à plusieurs autres paramètres comme le type de connexion implantaire (externe ou interne), le diamètre de l'embase ou encore les conditions de mise en œuvre (comme le protocole de collage ou le type de colle).

Pour toutes ces raisons, il apparaît clairement que le titane représente le matériau de choix pour concevoir les pièces nécessaires à la réalisation des PPIP.

4 Fabrication

Pendant plusieurs années ces PPIP ont été mises en forme par des techniques classiques de coulée. Néanmoins ces procédés présentaient quelques difficultés en rapport avec l'apparition de porosités notamment pour les parties fines (11), de contamination en oxygène (12) et de déformations réduisant fortement les propriétés mécaniques des pièces obtenues.

Puis grâce à l'apparition de la **fabrication assistée par ordinateur (FAO)** et de la chaîne numérique, ces techniques de coulée ont été progressivement remplacées au profit de l'usinage (13,14). Il s'agit d'un procédé soustractif où, à partir d'un bloc de titane précédemment coulé à haute température sous une pression adaptée, des fraises d'usinage dont la trajectoire est maîtrisée par le calcul informatique, vont venir sculpter l'objet. C'est par ce procédé que la plupart des pièces métalliques étaient jusqu'à présents obtenues, dans le domaine médical mais également dans d'autres domaines du quotidien.

Récemment, l'introduction d'un nouveau mode de procédé de fabrication, non plus soustractif mais additif, a modifié profondément la production de ces pièces métalliques. En effet les techniques additives dans leur ensemble présentent de nombreux avantages ergonomiques par rapport aux techniques soustractives, en termes de réduction des pertes de matières et de diminution du temps de production, mais surtout elles **permettent de fabriquer des pièces présentant une géométrie plus complexe, et plus spécifiquement en odontologie prothétique, permettant une adaptation spécifique en rapport avec la situation clinique traitée.**

Le principe des procédés additifs repose sur l'ajout de matière par empilement de couches successives. Plusieurs catégories de procédés additifs existent sur le marché en fonction du matériau que l'on souhaite mettre en œuvre et particulièrement sa composition chimique et son état brut (solide, liquide ou pulvérulent), du principe de création de couches, du principe de cohésion entre ces couches et de la technologie mise en œuvre (Figure 3). En ce qui concerne les matériaux métalliques en odontologie et plus particulièrement le titane et ses alliages, ils sont essentiellement obtenus par le biais du procédé de « fusion sélective sur lit de poudre »

connu sous différents acronymes : SLM (*Selective Laser Melting*), LBM (*Laser Beam Melting*) et plus récemment L-PBF (*Laser Powder Bed Fusion*).

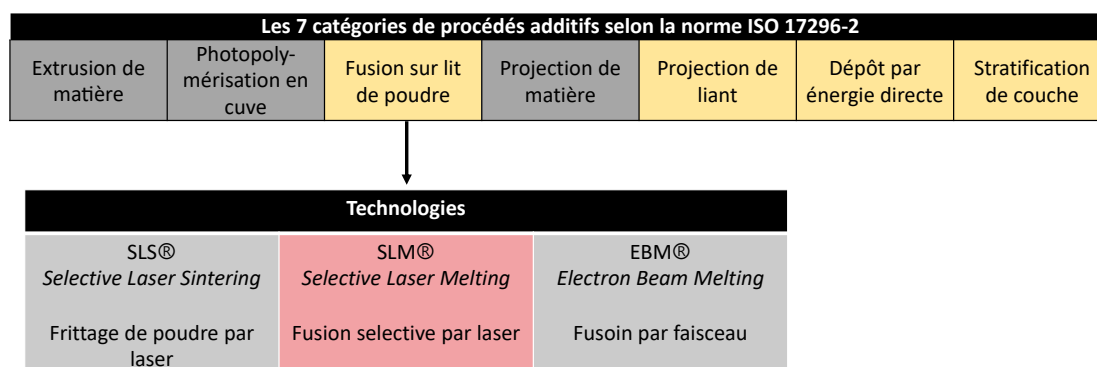


Figure 3 : Place de procédé SLM parmi les différentes techniques additives. En jaune : les catégories qui permettent de mettre en forme les alliages métalliques. En rose : le procédé communément utilisé en odontologie.

Il y a une dizaine d'années, les pièces prothétiques dento-portées en Co-Cr et les châssis métalliques ont été les premiers à bénéficier de ce procédé additif pour leur production (Figure 4). Plusieurs équipes ont alors analysé dans quelle mesure ce nouveau procédé de fabrication pouvait influencer le comportement mécanique des pièces obtenues (15). Les résultats ont vite permis de conclure que cette technique était viable pour la réalisation de chapes métalliques ou de châssis métallique permettant ainsi le déploiement de ce procédé dans les laboratoires de prothèses dentaires. Ceci explique qu'une part significative des pièces prothétiques produites actuellement et utilisées quotidiennement en clinique soient élaborées par technique additive.

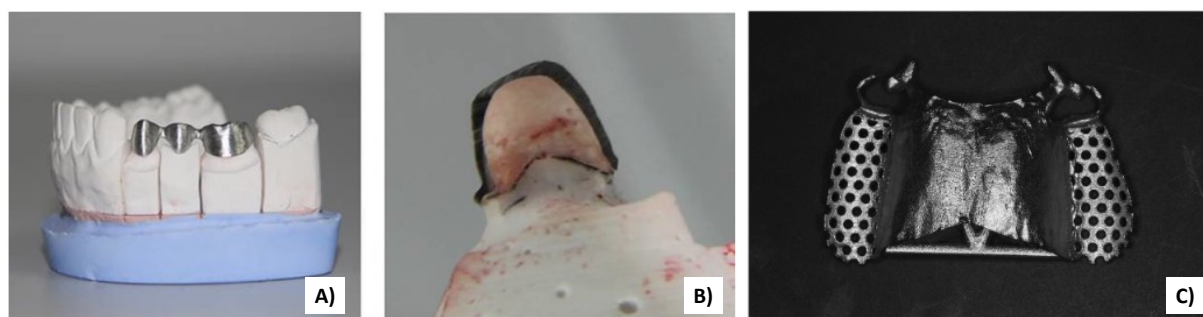


Figure 4: A) Photographies d'une armature de bridge obtenue par SLM et B) coupe transversale au niveau d'un pilier dentaire ; d'après Lu et al. 2017 (16). C) Photographie d'un châssis métallique obtenu par SLM ; d'après Chen et al. 2019 (17).

En effet, les premiers résultats des études ayant analysé l'influence du procédé SLM sur la mise en forme de pièces prothétiques dento-portées en Co-Cr ont conclu que ce procédé permettait d'obtenir des propriétés mécaniques similaires et parfois meilleures que ce soit en termes de résistance maximale à la traction ou de module d'élasticité (18). De plus, l'analyse de la résistance à la corrosion des pièces fabriquées montrait des résultats similaires à celles issues d'une fabrication par coulée ou par usinage. Enfin, les équipes qui s'étaient intéressées à la précision dimensionnelle des pièces fabriquées par SLM rapportaient dans l'ensemble que les pièces métalliques en Co-Cr obtenues par SLM présentaient une adaptation suffisante pour

garantir une utilisation cliniquement acceptable, que ce soit en pour la réalisation de chape métallique en prothèse conjointe (19,20) ou la mise en forme de châssis en prothèse amovible (17).

En revanche, ces premières études sur la mise en œuvre d'un alliage métallique tel que le Co-Cr ont unanimement rapporté **un état de surface caractéristique propre à la technique additive** : la surface est bien plus rugueuse qu'une surface obtenue par usinage.

Cette rugosité, dont l'étude sera plus détaillée dans le chapitre 2, explique pourquoi les pièces prothétiques supra-implantaires, n'ont dans un premier temps pas pu profiter des technologies additives. En effet, comme mentionné plus haut, ces éléments présentent la particularité de se composer d'une partie « connectique » destinée à venir s'insérer dans la partie supérieure de l'implant, ou sur une pièce intermédiaire dans le cas de prothèse supra-implantaire plurale. Cette partie nécessite donc une surface exempte de défauts de forme pour assurer une confrontation parfaite de la pièce prothétique dans la substructure de l'implant et garantir ainsi la stabilité mécanique de l'ensemble de la restauration. En effet, un défaut d'ajustage entre la surface de l'implant et celle du pilier peut entraîner l'apparition de complications mécaniques comme un desserrage de la vis (21), un décalage de l'assemblage ou même des complications biologiques consécutives à la pénétration de bactéries au niveau de la connexion (22).

5 Problématique

Très récemment, une solution a été proposée pour envisager la production de pièces prothétiques supra-implantaires par fusion sur lit de poudre. Il s'agit, après la fabrication de la pièce par technique additive, de **réaliser un usinage secondaire de la connectique** en réindexant le même plateau de fabrication dans une machine d'usinage (Figure 5).



Figure 5 : A) Schématisation de la fabrication hybride proposée par la société HEXAGON. 1) les fichiers issus de la CAO sont 2) intégrés dans un logiciel qui permet de préparer les pièces pour la fabrication additive. A l'issue de la fabrication additive (3), le plateau sur lesquelles les pièces viennent d'être construites est 5) directement inséré dans la machine d'usinage puisque le fichier possède déjà les informations nécessaires à la reprise par usinage (4). Source : Webinaire « Le Workflow des productions dentaires par Micro Fusion Laser Métal » (23).

Cette technique hybride permet de garantir une stabilité dimensionnelle, et ainsi d'obtenir des pièces présentant un état de surface satisfaisant pour s'ajuster parfaitement avec la morphologie de la partie supérieure de l'implant (Figure 6). Il s'avère donc désormais possible d'envisager la production de pièces implanto-portées à partir d'un alliage de titane par fusion sur lit de poudre (24–26).

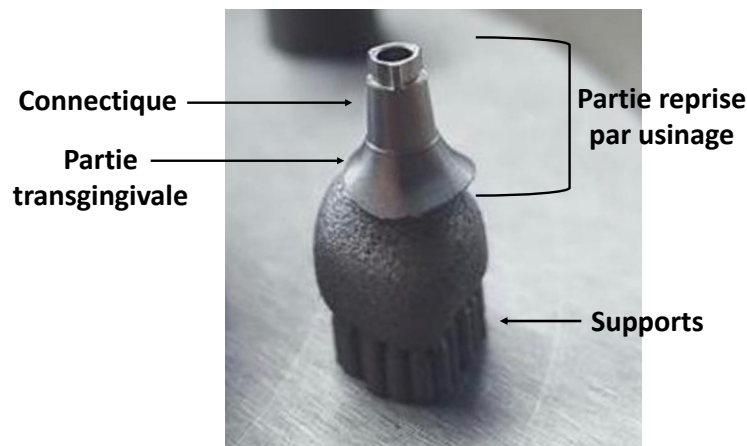


Figure 6 : Photographie d'un pilier supra-implantaire sur son plateau de fabrication obtenu par SLM. La partie la plus proche du plateau est destinée à être céramisée : l'état de surface brute SLM est conservé. La partie la plus éloignée du plateau a été reprise par usinage. Cette reprise concerne la connectique mais aussi la partie transgingivale. Source : « Le Workflow des productions dentaires par Micro Fusion Laser Métal » (23).

Cette fabrication hybride est très intéressante puisqu'elle permet **d'allier les bénéfices** des deux technologies, c'est à dire les avantages économiques et la liberté de la conception en termes d'architecture consécutives au procédé additif, et l'excellente intégrité de surface inhérente au procédé soustractif.

Néanmoins, la microstructure et l'état de surface des alliages de titane sont largement dépendants de leur procédé d'élaboration. Or les comportements mécaniques et biologiques des pièces obtenues sont liés aux **propriétés intrinsèques** et aux **topographies de surface macro et micro géométriques**.

C'est pourquoi, avant d'utiliser ces pièces en alliage de titane dans le cadre d'un dispositif médical en prothèse supra-implantaire, il faut s'assurer que ces dernières atteignent les performances qui leur sont assignées, c'est à dire être qu'elles sont aptes à remplir la ou les fonctions spécifiques visées en fonction de leur utilisation. Pour la réalisation de **PPIP**, il est impératif que la restauration produite respecte des critères mécaniques et biologiques préalablement définis dans le cahier des charges.

De plus, puisque ces pièces en alliage de titane sont amenées à faire partie de l'arsenal thérapeutique du praticien en odontologie implantaire dans les prochaines années, il est pertinent de se demander comment ces composants pourraient être optimisées notamment sur le plan biologique.

Chapitre 1. Influence du procédé SLM sur les propriétés mécaniques d'un alliage de titane

Le but de ce chapitre est dans un premier temps de donner les informations essentielles et les outils nécessaires à la compréhension de ces travaux de thèse en présentant le procédé SLM et les principaux paramètres associés à cette technique. Dans un deuxième temps, les caractéristiques de l'alliage de Ti6Al4V mis en forme par SLM seront rapidement décrites. Enfin, la lecture d'un article dédié à ce sujet permettra de détailler la caractérisation mécanique d'un titane Ti6Al4V mis en forme par SLM. Une synthèse viendra clôturer ce premier chapitre.

I-1 Fusion sélective par laser (*Selective Laser Melting*)

I-1-1 Quelques généralités sur le procédé

C'est dans les années 1990 qu'apparurent les premières fabrication additive (FA) pour matériaux métalliques. En effet, les premières méthodes de FA concernaient essentiellement la mise en forme de polymères. En 1995, la compagnie EOS commercialise la première machine de fusion sur lit de poudre métallique par laser : EOSINT M 250 avec une application essentiellement industrielle. Ce procédé a été alors dénommé « *Direct Metal Laser Sintering* » (DMLS) à l'origine du nom de marque lexicalisé « SLM » ou *Selective Laser Melting*, (Fusion laser sélective) qui est aujourd'hui l'appellation la plus souvent utilisée. On retrouve ce procédé dans la littérature scientifique également sous le nom LBM pour *Laser Beam Melting* ou L-PBF pour *Laser Powder Bed Fusion*. L'abréviation SLM sera utilisée dans le souci d'harmoniser le terme avec celui utilisé dans les publications scientifiques présentées.

Même si d'autres technologies existent (comme la technique EBM ou *Electron Beam Melting*), c'est le procédé SLM qui a été retenu en odontologie pour la mise en forme de dispositifs médicaux métalliques car la résolution spatiale des pièces, le respect des cotes et l'état de surface brute de fabrication sont environ deux fois plus favorables en SLM en raison du diamètre du laser ($<100\ \mu\text{m}$) deux à trois fois plus petit que le faisceau d'électrons focalisés.

Le principe, illustré dans le figure 7, est le suivant : initialement le fichier numérique 3D de la pièce à réaliser, généralement sous forme d'un fichier .stl avec le contour de la pièce discrétisé par des triangles et leur vecteur normal, est divisée en strates successives (opérations de *slicing*). Le procédé consiste alors à faire fondre une fine couche de poudre, préalablement étalée sur un plateau de fabrication à l'aide d'un faisceau d'énergie. Cette couche de poudre correspond à la strate virtuelle découpée dans le fichier 3D numérique source. Une fois la couche fondue, le plateau de fabrication descend d'une hauteur constante prédéfinie par l'utilisateur puis le racleur superpose une nouvelle couche de poudre. Cette nouvelle couche est alors fondue sur la première. C'est l'empilement de toutes les couches qui permet d'obtenir *in fine* la pièce finie.

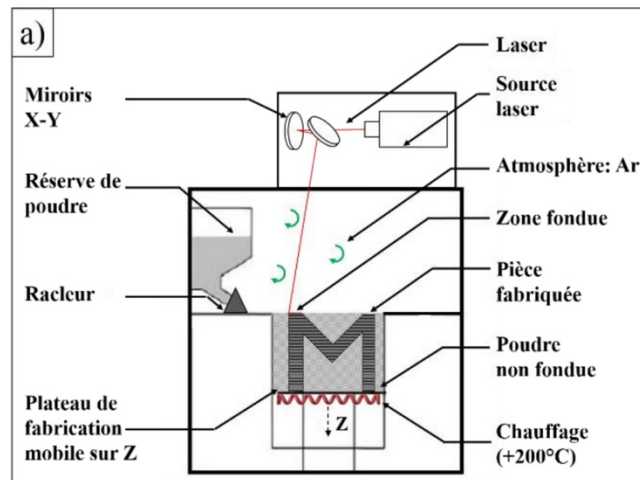


Figure 7 : Schéma du procédé SLM ; d'après Andreau 2019 (27).

Dans le cas du procédé SLM, la source d'énergie utilisée pour faire fondre la poudre est généralement un laser Nd-YAG de longueur d'onde proche de $1.08 \mu\text{m}$. La fabrication est réalisée dans une atmosphère contrôlée (inertée avec un gaz neutre en légère surpression comme de l'argon) pour éviter des risques d'oxydation. La teneur en O_2 ne doit pas dépasser quelques centaines de ppm, en particulier sur le titane. La chambre est à température ambiante, mais le plateau de fabrication peut être préchauffée afin de limiter les contraintes résiduelles issues de la fabrication. Afin de maintenir la pièce en position pendant la fabrication, il est généralement nécessaire d'ajouter des supports sur les surfaces en contre-dépouilles (la tête en bas). Ces derniers permettent aussi de conduire la chaleur vers le plateau et éviter ainsi une éventuelle déformation des pièces.

I-1-2 Paramètres de fabrication

Cette fabrication est dépendante de nombreux paramètres.

Les premiers sont relatifs à la **poudre métallique** qui va être utilisée pour la fabrication. Ainsi, la distribution granulométrique, la forme des particules, la composition chimique (et notamment la teneur en oxygène) et la conservation de cette dernière vont jouer un rôle dans les propriétés finales aussi bien mécaniques que physico-chimiques.

Les deuxièmes paramètres sont ceux relatifs à l'étape de fabrication. Ainsi, le choix de la **machine** et la **paramétrie** imposée ont une importance primordiale (Figure 8). Il s'agit de :

- la puissance du laser (W),
- la vitesse de balayage (mm/s)
- le diamètre du spot laser (μm)
- l'épaisseur de couche (μm)
- l'écart vecteur (ou *Hatch spacing*), c'est-à-dire l'espacement entre 2 lignes de passage du laser (μm)
- la stratégie de balayage (motif parcouru par le laser)
- la *hatch angle* définit comme l'angle entre le motif de deux couches successives
- l'orientation de la pièce par rapport au plateau de fabrication (direction de construction).

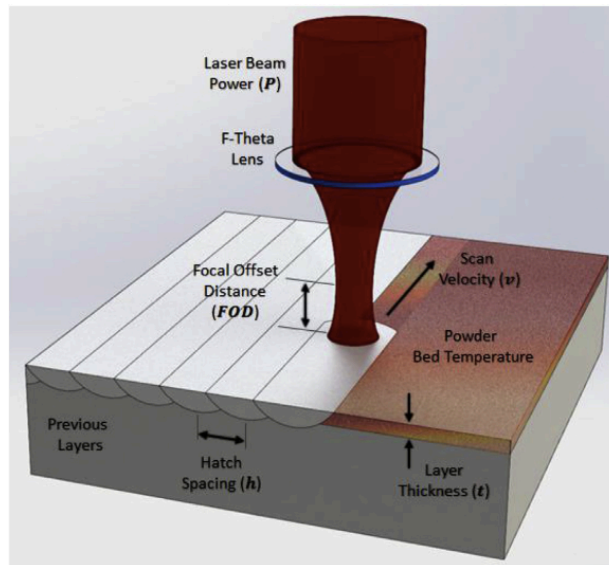


Figure 8 : Schéma représentant les principaux paramètres clé du procédé SLM. Avec Laser Beam Power : puissance laser ; Focal Offset Distance : distance focale ; Scan Velocity : vitesse de balayage ; Powder Bed Temperature : température du lit de poudre ; Hatch Spacing : écart vecteur, Layer Thickness : épaisseur de couche ; Previous Layer : couches précédentes ; F-Théta lens : lentilles F-Theta ; d'après Shipley et al. 2018 (28).

Certains de ces paramètres sont modifiables par l'opérateur (comme la puissance, la vitesse de balayage ou le diamètre du spot laser par la délocalisation du faisceau) alors que d'autres sont fixés par la machine et le fabricant. Afin de rationaliser les effets des paramètres du procédé, la « densité énergétique » est souvent utilisée. Elle correspond à l'énergie transmise par le laser et s'exprime selon différentes formes. La plus connue est la densité d'énergie linéique exprimée en J/mm dont la formule est la suivante :

$$\varphi = \frac{P}{V}$$

L'optimisation paramétrique consiste à identifier des couples vitesse et puissance « idéaux » pour que la densité d'énergie soit optimisée afin de limiter le plus possible la formation de défauts (porosités, fissures), et de garantir la qualité de la pièce obtenue.

Enfin, les derniers paramètres qui influencent les propriétés des pièces obtenues sont ceux associés **aux post-traitements**, et notamment les traitements thermiques appliqués aux pièces après leur fabrication.

C'est l'optimisation de tous ces paramètres qui permet de limiter les déformations et l'écart aux cotes initiales, les contraintes résiduelles et la présence des porosités afin de garantir des propriétés mécaniques optimales.

I-2 Propriétés générales des pièces en alliages TiAl64V élaborées par SLM

Étant le plus utilisé dans le secteur médical, l'utilisation de l'alliage de grade 5 Ti6Al4V (ou TA6V en norme française) a rapidement été développée en fabrication additive. Sa composition pondérale est rappelée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Composition pondéral de l'alliage de Ti6Al4V selon la norme ASTM F2924 (29).

Éléments	Ti	Al	V	Fe	H	C	N	O
Composition (% massique)	reste	5,5-6,75%	3,5-4,5%	0,3%	<0,015%	0,08%	<0,05%	<0,2%

Les deux principaux composants de cet alliage sont l'aluminium et le vanadium. L'aluminium est un élément dit α -gènes, c'est-à-dire qu'il va favoriser la phase α hexagonale compacte (HC). Il permet, quand il est ajouté dans une proportion limitée d'améliorer la résistance mécanique par rapport à un titane pur en s'intégrant en substitution dans la maille hexagonale. En revanche il diminue la ductilité. L'oxygène, le carbone et l'azote sont aussi des éléments α -gènes se positionnant quant à eux en insertion. Le vanadium est un élément β -gène (favorisant la phase β cubique centrée) qui permet également en petite proportion d'améliorer la ductilité, lorsqu'il est présent en substitution dans la phase cubique. L'hydrogène est aussi un élément β -gène présent en insertion. Cette composition chimique permet à l'alliage de Ti6Al4V de stabiliser à température ambiante les phases α et β . On dit que l'alliage de Ti6Al4V est un alliage $\alpha+\beta$. Le pourcentage de chaque phase a un impact important sur les caractéristiques de l'alliage. Son point de fusion est aux alentours de 1670° mais la température de transformation de la phase β appelée « transus bêta » se situe, elle, aux alentours de 880-900°C (Figure 9).

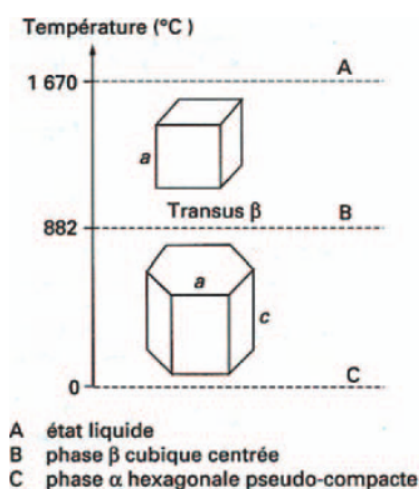


Figure 9 : Cristallographie du titane pur ; d'après Combres 1995 (30).

Les principales caractéristiques des alliages de titane sont :

- leur faible masse volumique ($\sim 4.5 \text{ g/cm}^3$) entraînant des pièces avec un poids bien plus faibles qu'avec d'autres alliages
- leur faible module d'Young (autour de 110 GPa contre 210 GPa sur un acier inoxydable)
- leur excellente résistance à la corrosion dans de nombreux milieux grâce à la formation d'une couche de passivité
- leur faible coefficient de dilatation (autour de 9.10^{-6} K^{-1} contre 23.10^{-6} sur un inox)
- leur amagnétisme
- leur faible conductivité thermique et électrique.

Comme l'a mentionné l'introduction, le procédé SLM va modifier les caractéristiques du Ti6Al4V mis en forme par rapport aux techniques de coulée. Ce point sera rediscuté dans l'article présenté dans le paragraphe I-3 mais afin d'assurer une parfaite compréhension, quelques points sont à présenter avant la lecture de ce dernier.

I-2-1 Rugosités des pièces

Tout d'abord, il faut savoir que la **rugosité** va être affectée. L'empilement des différentes couches va créer une forte rugosité, particulièrement sur les côtés de la pièce fabriquée due notamment à la présence de particules non fusionnées (Figure 10) et favorisée par une inclinaison prononcée par rapport à la verticale. En fonction de tous les autres paramètres cités plus haut, la rugosité arithmétique moyenne R_a est comprise entre 5 et 30 μm (31). Diverses solutions ont été proposés pour diminuer cette rugosité, comme le sablage, la tribofinition, l'utilisation de poudre plus fine ou encore plusieurs passages du laser.

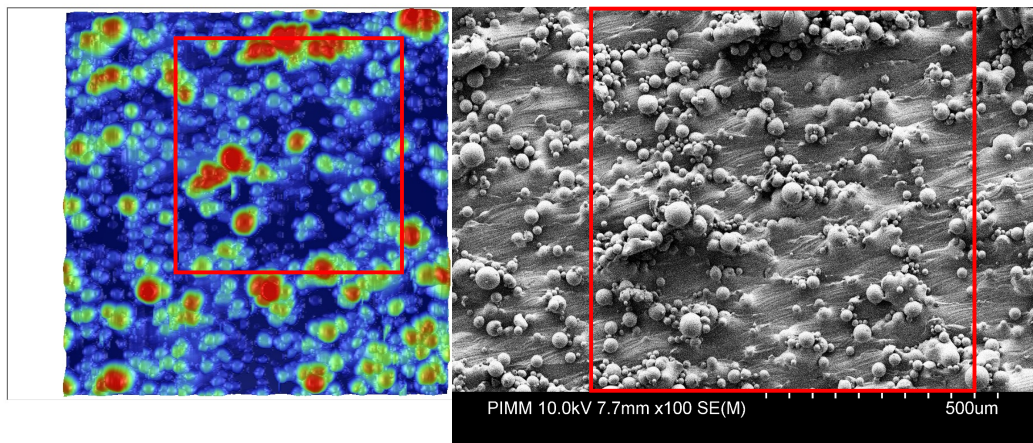


Figure 10 : Surface d'une pièce obtenue par SLM avec la présence de particules non fusionnées. À gauche analyse de la topographie de surface par profilométrie mécanique et à droite l'image de la même zone observée au MEB. Source : personnelle.

I-2-2 Porosités dans les pièces

La densité obtenue après fabrication additive par SLM est très bonne quand les paramètres sont optimisés dans ce but. En effet, même s'il arrive qu'un certain taux de porosités soit volontairement créé dans le cas de fabrication de *scaffold* osseux, par exemple, en ingénierie tissulaire, cette densité peut dépasser 99.5% quand les paramètres précédemment rapportés sont optimisés (32). En revanche, si ces paramètres ne sont pas optimisés, certains défauts peuvent apparaître. Par exemple, si l'énergie linéique P/V préalablement décrite est insuffisante (vitesse de balayage trop rapide ou puissance du laser insuffisante), les recouvrements entre cordons de fusion adjacents sont trop faibles et il apparaît alors des « manque de fusion » (33). Ce type de porosités, de géométrie anguleuse, est également favorisée par un écart-vecteur (ou *Hatch spacing*) est trop important (34).

À l'inverse, si la densité énergétique est trop importante des déformations thermiques provoquant un surélévation local du lit de poudre et/ou la vaporisation de certains éléments d'alliage (par exemple Al dans le Ti6Al4V) peuvent aboutir à la formation de pores *key holes*,

liés à un mode de fusion trop pénétrant (35). Tous ces défauts peuvent influencer les propriétés mécaniques et l'analyse de leurs effets s'avère indispensable pour comprendre le comportement des pièces obtenues.

I-2-3 Particularités microstructurales

Enfin, le procédé détermine la **microstructure** du Ti6Al4V mis en forme. Le titane présente une grande variété de microstructure en fonction de son élaboration. En SLM, les conditions thermiques inhérentes au dépôt de puissance laser (intense et très local) et la cinétique de refroidissement rapide (d'environ 10^5 à 10^7 K/s) vont jouer un rôle sur le rendu microstructural des pièces (36). Pour comparaison, ces conditions cinétiques sont deux à trois fois supérieures à la vitesse critique de trempe de l'alliage de Ti6Al4V permettant la formation de la phase α' martensitique.

À faible grandissement, la microstructure est colonnaire par rapport à l'axe de construction. En d'autres termes il s'agit de grains allongés dans la direction de fabrication des pièces (Figure 11). Ces colonnes sont décrites comme la trace des anciens joints de grains β (stables à haute température) retransformés en phase α ou α' à basse température. La présence de ces grains colonnaires résulte d'une épitaxie de croissance d'une couche à une autre : lors de la solidification, les grains croissent dans la continuité des grains présents dans les couches sous-jacentes et dans la direction du gradient thermique principal. Par ailleurs, le cycle thermique global vu par chaque point de la matière correspond à 1 ou 2 cycles de fusion-solidification suivis d'un recuit thermique en phase solide sous l'effet des couches SLM ultérieures.

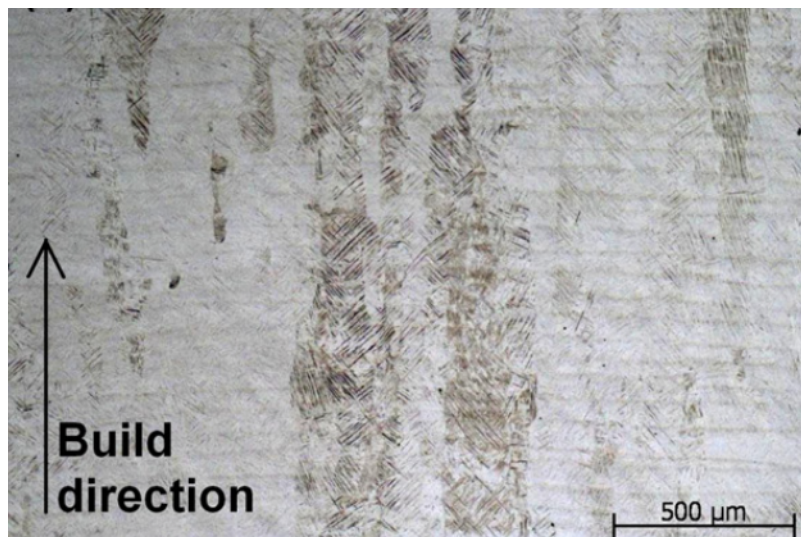


Figure 11 : Microstructure colonnaire du Ti6Al4V issu de SLM ; d'après Vrancken et al. 2012 (36).

A un grandissement plus élevé, la microstructure se révèle formée par des aiguilles très fines (Figure 12). On retrouve des aiguilles α' primaires, secondaires et tertiaires en fonction de leurs tailles et de leur ordre d'apparition lors de la solidification. Ces aiguilles sont identifiées comme une phase α' martensitique qui croît à partir des grains préliminaires β suite au refroidissement rapide des pièces (37). Cette phase α' possède une structure hexagonale de paramètres de maille proches de ceux de la phase α .

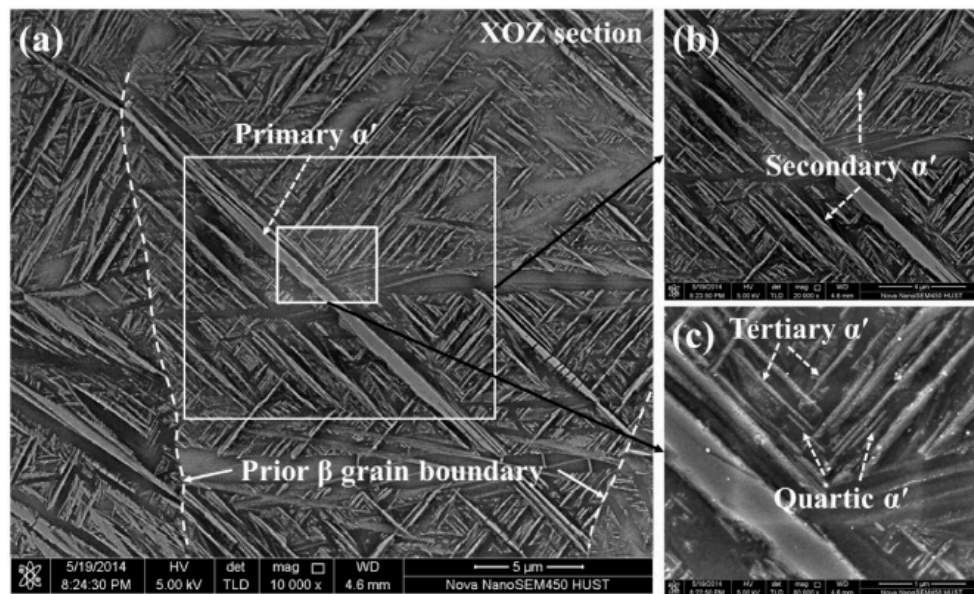


Figure 12 : Micrographie MEB d'une section de Ti6Al4V après attaque chimique révélant la microstructure ; d'après Yang et al. 2016 (34).

Cette microstructure particulière confère aux pièces brutes obtenues des propriétés mécaniques qui peuvent s'avérer insuffisantes pour certaines applications, notamment en termes de ductilité, pour être utilisées brute de fabrication (38). Ainsi, dans le domaine biomédical, les pièces subissent **systématiquement des post traitements thermiques secondaires** à leur mise en forme. Plusieurs traitements thermiques sont alors possibles en fonction de la température appliquées :

- Soit un simple traitement thermique de relaxation des contraintes est effectué, par exemple à 593 °C pendant 2 h selon la norme AMS 2801 (39). Ce traitement provoque une diminution des contraintes résiduelles avec peu de modifications microstructurales.
- Soit un post traitement thermique légèrement en dessous du transus bêta ($T_{\beta} \sim 900$ °C) avec un refroidissement lent autour de $T \sim 800-850$ °C. Ce type de post traitement permet de passer d'une microstructure martensitique α' en aiguilles à une structure lamellaire $\alpha + \beta$ sans changement de la taille des anciens grains β .
- Soit un post traitement thermique au-dessus du transus bêta (température aux alentours de 950-1050 °C) est appliqué. Ce dernier, combiné à un refroidissement lent (< 5 °C/s) permet quant à lui une transformation plus marquée de la microstructure, qui devient généralement cellulaire ou en vannerie, composée de lattes α ayant germée à partir des anciens joints de grains β présents sous forme de liseré (40). La taille des lattes α tend à augmenter avec les vitesses de refroidissement les plus lentes.

Tous ces post traitements améliorent la ductilité des pièces issues de FA, mais généralement au détriment des autres propriétés comme la limite d'élasticité ou la résistance en traction (41). Ainsi, un compromis doit être trouvé, qui n'est possible qu'à travers l'études étudiant des propriétés mécaniques.

I-3 Propriétés mécaniques en traction du titane Ti6Al4V fabriqués par SLM

Afin de vérifier les caractéristiques du produit massif par caractérisation des propriétés mécaniques il existe des essais normalisés selon les normes ISO. À ce jour, il n'existe pas de norme spécifique pour les dispositifs prothétiques supra implantaires.

Lors de la recherche présentée dans l'article présenté ci-dessous, il a été décidé à la fois :

- de comparer les propriétés mécaniques d'un alliage de titane obtenu par SLM avec celles d'un alliage obtenu par usinage traditionnellement utilisé pour la réalisation de PPIP
- de se référer à la norme ISO 22674 (42), qui permet de déterminer des valeurs minimales nécessaires à atteindre pour les matériaux métalliques à usage dentaire.

Les pièces étudiées dans ce premier chapitre ont été commandées à un fabricant réalisant d'ores et déjà des pièces en cobalt-chrome en fusion sur lit de poudre pour de la prothèse supra dentaires conventionnelles (type armature de bridge). Le choix s'est porté sur des pièces fabriquées à partir d'une poudre de 25 à 54 µm de diamètre de Ti64-53/20® (Tekna Advanced Materials Inc., Sherbrooke, Canada). Cet alliage de Ti6Al4V de grade 23 est dit « ELI » c'est à dire *Extra Low Interstitials*. Il contient moins d'oxygène et de fer que le Ti6Al4V classique. Les paramètres de fabrication ont été choisis par le fabricant. Ces pièces ont ensuite subi le traitement supersolvus suivant : 20 min à 100°C dans un four dédié à cet effet sous flux d'argon, puis une montée en température du four jusqu'à 1050°C en 45min et enfin un maintien du four à la température de 1050°C pendant 2h. Les mêmes pièces serviront pour les essais de cytotoxicité dans le chapitre 2. En revanche, pour les expérimentations présentées dans le dernier chapitre, les paramètres de fabrication ont pu être maîtrisés et seront exposés.

Référence de la publication :

MJ. Crenn, A. Benoit, JP. Attal, O. Fromentin. Comparison of Mechanical Properties of CAD/CAM-Milled and Selective Laser-Melted Ti-6Al-4V for Dental Superstructures. Int. J. Prosthodont. 2018; 31, 591–593. doi: 10.11607/ijp.5885.

Comparison of Mechanical Properties of CAD/CAM-Milled and Selective Laser-Melted Ti-6Al-4V for Dental Superstructures

Marie-Joséphine Crenn, DDS, MSc¹/Aurélié Benoit, PhD²/
Jean-Pierre Attal, DDS, PhD³/Olivier Fromentin, DDS, PhD⁴

Purpose: To determine whether selective laser melting (SLM) is suitable for the fabrication of dental superstructures. **Materials and Methods:** Mechanical properties of Ti-6Al-4V, manufactured with SLM or numerically controlled milling, were evaluated and compared. **Results and Conclusion:** Both groups showed a mechanical strength greater than 500 MPa and an elongation greater than 2%, as required by the International Organization for Standardization 22674 standard. However, a reduced ductility was observed for SLM samples. *Int J Prosthodont* 2018;31:591–593. doi: 10.11607/jip.5885

Titanium alloys, including Ti-6Al-4V, have been widely used in prosthodontics to manufacture implant-supported fixed dental prostheses because of their excellent biocompatibility, high corrosion resistance, and mechanical properties. Traditionally, implant-supported superstructures made of Ti-6Al-4V have been manufactured with casting or numerically controlled (NC) milling based on a three-dimensional computer-aided design (CAD) file. In the last decade, additive manufacturing has expanded rapidly for medical and dental applications,¹ since it can produce objects with complex geometries, strong individualization, and less material waste. For implant denture superstructures made of Ti-6Al-4V, the chosen additive process is selective laser melting (SLM), in which the solid component is built layer by layer via local melting of a metal powder under a high-power laser beam. As dental appliances are subjected to repeated mechanical loading

during mastication, the selected material for fabrication must comply with the International Organization for Standardization (ISO) 22674 standard,² which specifies the required mechanical properties for the realization of dental devices. The purpose of this study was therefore to evaluate and compare the mechanical properties of Ti-6Al-4V prepared with NC milling or with SLM to ensure that additive manufacturing is suitable for dental superstructures according to the ISO 22674 standard.

Materials and Methods

NC-milled specimens were manufactured with an NC milling machine (CORiTEC 350, Imes-locore) from a Copra Ti-5 (Whitepeaks Dental Solutions) metal disc without any thermal posttreatment. SLM specimens were manufactured with SLM (Truprint 1000, Trumpf) from a Ti-64-53/20 (Tekna Advanced Materials) spherical powder whose particle diameter spanned 20 to 53 μm . Posttreatment was performed according to manufacturer instructions: An initial heat treatment was performed at 100°C for 20 minutes under an argon gas atmosphere followed by progressive heating from 100°C to 1,050°C over the course of 45 minutes, ending with a plateau at 1,050°C for 2 hours. The specimens were finally cooled to room temperature in the furnace. The chemical compositions of the specimens were very similar and are detailed in Table 1. Microstructure was revealed using Kroll reactant and observed with scanning electron microscopy (SEM).

Following ISO 22674 guidelines, tensile tests were performed on six cylindrical specimens (3-mm diameter, 18-mm gauge length) for each group using a universal testing machine (Instron 4482) equipped

¹Assistant Professor, Unité de Recherche, Biomatériaux, Innovations et Interfaces, Paris Descartes University, Paris Diderot University, Rothschild Hospital, Paris, France.

²Associate Professor, Unité de Recherche, Biomatériaux, Innovations et Interfaces, Paris Descartes University, Paris, France.

³Associate Professor, Unité de Recherche, Biomatériaux, Innovations et Interfaces, Paris Descartes University, Charles Foix Hospital, Paris, France.

⁴Professor, Unité de Recherche, Biomatériaux, Innovations et Interfaces, Paris Descartes University, Paris Diderot University, Rothschild Hospital, Paris, France.

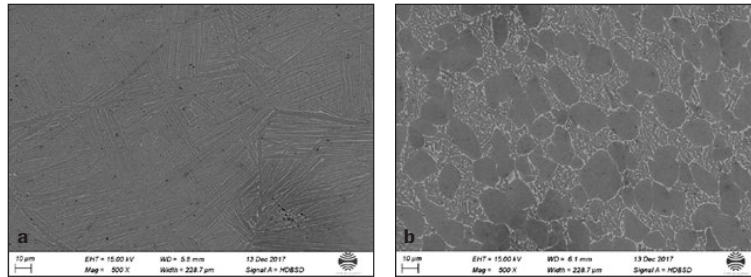
Correspondence to: Dr Marie-Joséphine Crenn, Faculty of Dental Surgery, Paris Descartes University, 1 rue Maurice Arnaud, 92120 Montrouge, France.
Email: marie-josephine.crenn@univ-paris-diderot.fr

©2018 by Quintessence Publishing Co Inc.

Table 1 Chemical Compositions of the Ti-6Al-4V Specimens (Mass Percent)

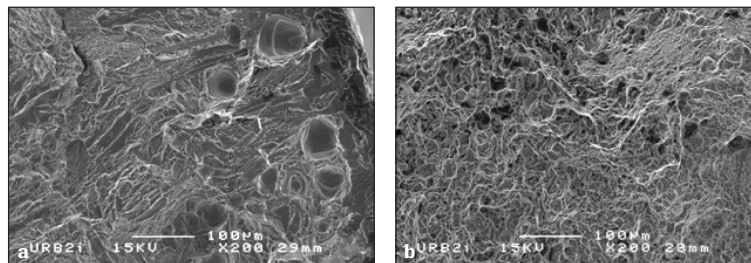
	Ti	Al	V	Fe	Y	C	O	N	H	Other
Ti-64-53/20 (SLM)	≈ 90	6.18	4.03	0.140	< 0.001	0.006	0.063	0.016	0.002	< 0.05
Copra Ti-5 (milled)	≈ 90	5.5–6.5	3.5–4.5	0.25	–	0.08	0.13	0.05	0.012	–

SLM = selective laser melting; Ti = titanium; Al = aluminum; V = vanadium; Fe = iron; Y = yttrium; C = carbon; N = nitrogen; O = oxygen; H = hydrogen.

**Fig 1** Microstructure observed with scanning electron microscopy (SEM) of the (a) selective laser melting (SLM) specimens and (b) milled specimens.**Table 2** Mechanical Properties of the Ti-6Al-4V Specimens (Mean ± Standard Deviation)

Group	Young modulus (GPa)	UTS (MPa)	0.2% Yield strength (MPa)	Elongation at break (%)
SLM	118 ± 4	959 ± 8	827 ± 12	4.7 ± 0.9
Milled	124 ± 4	933 ± 8	877 ± 8	15.9 ± 2.9
<i>P</i> value ^a	.015	< .001	< .001	< .001

^aStudent *t* test. SLM = selective laser melting; UTS = ultimate tensile strength.

**Fig 2** Scanning electron microscopy (SEM) images of fractured surfaces of the (a) selective laser melting (SLM) specimens and (b) milled specimens.

with a 30-kN load cell. Tests were conducted at room temperature, at a crosshead speed of 1 mm/minute, and using a 12.5-mm gauge length axial extensometer. Young modulus (E), ultimate tensile strength, 0.2% yield strength, and elongation at break (A) were measured on stress-strain curves. Results were analyzed using Student *t* test ($\alpha = .05$). Fracture surfaces were observed with scanning electron microscopy (SEM).

Results

Figure 1 shows the microstructures observed after NC milling and SLM manufacturing. The globular microstructure is typically observed after the conventional

process, whereas the lamellar microstructure of the equilibrium of the $\alpha + \beta$ phases is characteristic of the SLM process after a heat treatment above the β transus (980°C).

Statistically significant differences were observed for all mechanical parameters listed in Table 2. SLM specimens showed lower Young modulus, 0.2% yield strength, and elastic modulus, whereas they showed a higher ultimate tensile strength than NC-milled specimens.

Fracture surfaces in both materials revealed microvoids representative of the fracture of ductile materials (Fig 2). For SLM specimens, some larger pores—probably due to unmolten particles—were also observed close to the outer surface.

Discussion

Both materials complied with the ISO 22674 guidelines (elongation at break > 2% and 0.2% yield strength > 500 MPa) and can therefore be used for fabrication of implant denture superstructures.

The SLM process affected the mechanical properties of the material. However, only the difference in ductility was mechanically and clinically relevant, since the other parameters showed similar values from a mechanical point of view. This reduced ductility can be explained by the lamellar microstructure resulting from the SLM process and by the potential presence of unmolten particles and porosities. These characteristics are affected by many factors, such as particle size distribution of the metallic powder, processing parameters,³ and postprocessing treatment.^{4,5} Compared to the as-built material, the chosen heat treatment improved ductility by promoting a more lamellar structure and by reducing material porosity, enabling the material to fulfill the ISO 22674 requirements. However, properties such as fatigue properties, surface texture, and biocompatibility of Ti-6Al-4V alloys manufactured with SLM technologies should also be investigated to ensure optimal outcomes for clinical services.

Conclusions

Both the evaluated groups showed an elongation at break greater than 2%, as required by the ISO 22674 standard. However, a reduced ductility was observed for SLM samples.

Acknowledgments

The authors thank Stephane Le Goff from URB2i and the Centre des Matériaux (Mines ParisTech) for SEM images; Nicolas Roubier for technical support; and Edentech and Circles4labs for providing the specimens. The authors report no conflicts of interest.

References

1. van Noort R. The future of dental devices is digital. *Dent Mater* 2012;28:3–12.
2. International Organization for Standardization. ISO 22674:2006. Dentistry—Metallic materials for fixed and removable restorations and appliances. <https://www.iso.org/standard/36412.html>. Accessed 24 May, 2018.
3. Kasperovich G, Hausmann J. Improvement of fatigue resistance and ductility of TiAl6V4 processed by selective laser melting. *J Mater Process Technol* 2015;220:202–214.
4. Sallica-Leva E, Caram R, Jardini AL, Fogagnolo JB. Ductility improvement due to martensite α' decomposition in porous Ti-6Al-4V parts produced by selective laser melting for orthopedic implants. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;54:149–158.
5. Benedetti M, Torresani E, Leoni M, et al. The effect of post-sintering treatments on the fatigue and biological behavior of Ti-6Al-4V ELI parts made by selective laser melting. *J Mech Behav Biomed Mater* 2017;71:295–306.

I-4 Synthèse & limites

Pour supporter les sollicitations mécaniques intra-orales lorsqu'il est soumis à une force, le matériau mis en forme doit présenter des caractéristiques mécaniques en accord avec son application en termes de module d'élasticité (qui caractérise la rigidité d'un matériau), de limite d'élasticité (contrainte au-delà de laquelle le matériau va commencer à subir une déformation permanente dite plastique) et de ductilité (capacité à se déformer plastiquement sans se rompre).

Les résultats de l'étude présentée ci-dessus montrent que l'alliage de titane Ti6Al4V mis en forme par SLM selon la paramétrie du fabricant, présente une limite d'élasticité supérieure à 500 MPa et un allongement à la rupture supérieur à 2%, ce qui le rend compatible mécaniquement avec la réalisation de n'importe quel type de restauration prothétique selon la norme ISO-22674 (à l'exception faite des fines prothèses partielles amovibles, des pièces à section mince ou des crochets pour lesquels le module d'Young doit être supérieur à 150 GPa). Il a été également montré que ces propriétés sont cliniquement comparables à celles pièces

obtenues de nos jours par usinage pour la limite d'élasticité, la résistance maximale à la traction et le module d'Young.

En revanche, même si la ductilité est supérieure à celle requise par la norme ISO 22674 et malgré la réalisation des traitements thermiques, la ductilité est statistiquement plus faible pour le Ti6Al4V obtenu par SLM que pour le Ti6Al4V obtenu par usinage à partir d'un bloc de titane coulé. De plus, cette ductilité est inférieure à celle requise par la norme ASTM F2924 (29) relative aux pièces en Ti6Al4V fabriquées par fusion sur lit de poudre.

La figure 13 compare les valeurs obtenues à celles issues de deux revues de la littérature (43,44). Le graphique A) compare les plages de limites d'élasticité d'un alliage de Ti6Al4V en fonction du moyen de FA utilisé. L'encadré jaune représente les propriétés des pièces issues de procédés de fabrication additive sur lit de poudre **avec ou sans post traitements**. Il apparaît que la valeur d'allongement à la rupture obtenue, d'environ 5%, se situe dans la plage inférieure des valeurs mentionnées dans la littérature. Le graphique B) reporte les valeurs des études sur des échantillons bruts de fabrication par des cercles et par des carrés pour des échantillons post-traités thermiquement. À nouveau, nos valeurs (figurées par l'intersection en rouge) s'avèrent inférieures aux valeurs récemment publiées dans la littérature.

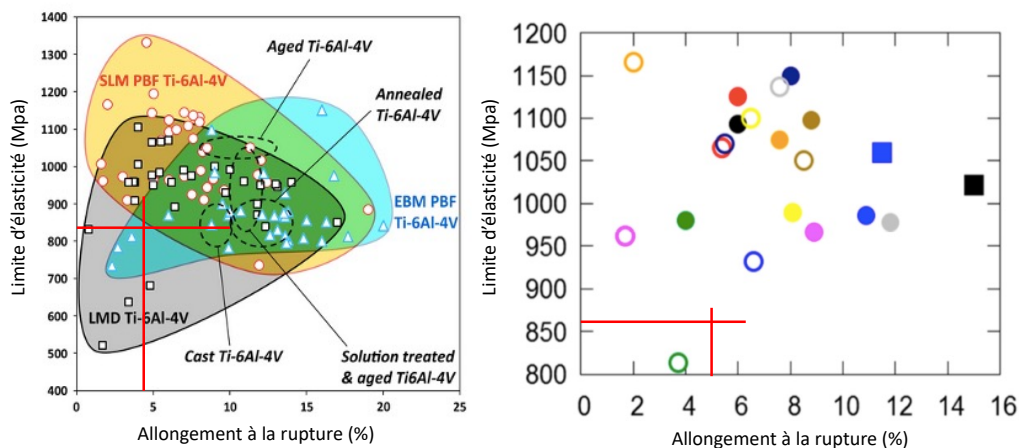


Figure 13 : Evolution de la limite d'élasticité de pièces en Ti6Al4V obtenues par FA en fonction de l'allongement à la rupture issues de 2 revues de la littérature. Le graphique A) représente différents procédés additifs. La plage jaune représente les valeurs pour des pièces issues de SLM avec ou sans post-traitements thermique; d'après Gorsse et al. 2017(42). Le graphique B) représente l'évolution pour des pièces obtenues par SLM, avec ou sans post-traitements thermiques; d'après Agius et al. 2018 (43).

Cette ductilité plus faible peut être liée aux traitements thermiques imposés, à la finition de surface des éprouvettes, mais surtout au taux d'O₂ dans les pièces connu pour faire chuter la ductilité sur les alliages de titane au-delà de 1500 ppm O₂ (0.15 %).

En effet, puisque les pièces ont été fabriquées par un fabricant extérieur, il a été impossible de contrôler le degré d'oxydation de la poudre utilisée et le % d'O₂ dans l'enceinte de travail. Pourtant, le taux d'O₂ dans les pièces varie en fonction de la conservation de la poudre, de son vieillissement mais surtout en fonction de son taux de recyclage, c'est à dire en fonction du nombre de fois où elle a été utilisée (45). En effet, la poudre qui n'est pas fusionnée est recyclée par tamisage entre 2 fabrications. Lors des cycles de fabrication-recyclage successifs, elle est susceptible de se contaminer en oxygène. L'allongement à la rupture de l'ordre de 5% peut être la conséquence directe d'une poudre oxydée après plusieurs utilisations (46).

Il est également possible d'imaginer des post-traitements thermiques différents de ceux qui ont été réalisés. En effet, les pièces présentant le meilleur compromis ductilité/rigidité dans le graphique présenté dans la figure 13.B) ont subi un traitement thermo-mécanique ou HIP (*Hot Isostatic Pressing*) conduit typiquement à 900°C sous 1000 bars pendant 2h. Il permet d'obtenir une structure lamellaire avec des lamelles plus épaisses qu'un simple traitement *subtransus* et la disparition quasi complète des porosités.

Malgré des résultats encourageants, ce chapitre démontre tout l'intérêt de contrôler la totalité des paramètres de fabrication pour maîtriser les propriétés finales des pièces.

Si le procédé modifie les caractéristiques internes de la matière, il en est de même pour l'état de surface. Or, il est largement reconnu que le comportement des cellules humaines au contact d'un matériau dépend entre autres, des propriétés de surface de ce dernier. Certaines PPIP étant au contact de la gencive, il est important de s'interroger quant à la compatibilité entre l'état de surface et l'application désirée.

Ainsi, le prochain chapitre de ce travail est consacré à l'évaluation de la réponse biologique à travers la réalisation des tests direct de cytotoxicité *in vitro* afin d'apprécier la prolifération et l'adhésion cellulaire de fibroblastes gingivaux d'origine humaine sur une surface fabriquées par SLM.

Chapitre 2. Influence du procédé SLM sur la réponse biologique des cellules gingivales

II-1 L'importance de la partie transgingivale en prothèse implanto-portée

Le succès de la thérapeutique implantaire est largement documenté. Un taux de survie élevé a été rapporté dans de nombreuses méta-analyses. On retiendra qu'il est de l'ordre de 97 % à 5 ans (47) et autour de 90% à 10 ans (48).

Cependant, malgré ce taux de survie relativement élevé à court et moyen terme, l'apparition de complications implantaire à plus long terme est fréquente.

Parmi ces complications, celles d'origines **biologiques** sont reportées à 16.94 % à 16 ans (49). Ces complications peuvent aller de la simple mucosite définie comme une inflammation muqueuse autour de l'implant sans perte osseuse associée (50) à la péri-implantite à proprement parlé, définie comme par une inflammation des tissus mous péri-implantaires avec augmentation du sondage transmuqueux, une éventuelle suppuration et surtout une perte osseuse associée de plus de 3mm (51). La prévalence de la mucosite est estimée à 43 %, tandis que celle de la péri-implantite est estimée à 22% (52). Ces maladies péri-implantaires sont des événements pathologiques essentiels car leurs évolutions peuvent entraîner *in fine* la perte de l'implant. Il a été rapporté qu'environ 10 % des implants posés présenteront un épisode de péri-implantite à 10 ans avec ou sans évolution menant à la perte de l'implant (53).

Ainsi, il est évident que le succès implantaire à long terme ne dépend pas seulement d'une ostéointégration réussie mais également **d'une bonne santé à long terme des tissus mous péri-implantaires**. Dans le cas de prothèses supra-implantaires unitaires, ces tissus mous gingivaux sont situés, soit au contact direct du col implantaire (dans le cas des implants *Tissu Level*) soit en rapport avec la partie prothétique transgingivale correspondant au pilier (dans le cas des implants *Bone Level*) (Figure 14).

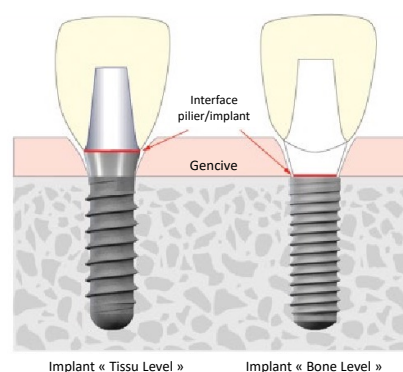


Figure 14 : Différence de la situation gingivale au niveau d'un implant *Tissu Level* et d'un implant *Bone Level* ; d'après Siebert et al. 2018 (54). Pour un implant *Tissu Level*, les tissus mous péri-implantaires se trouvent au niveau du col implantaire alors qu'ils se situent au niveau du composant prothétique transgingival pour un implant *Bone Level*.

Dans le cas de restaurations multiples où les implants sont destinés à être reliés ensemble, ces tissus mous peuvent être situés directement au contact de la barre ou de l'infrastructure, ou alors au contact d'un pilier de transition. Quoi qu'il en soit, toutes ces pièces possèdent jusqu'à présent une caractéristique commune de surfaces : elles sont « lisses ». La figure 15 montrent

la situation gingivale au contact de différents types de PPIP.



Figure 15 : Photographies de la situation gingivale au contact de piliers, d'une barre ou d'une suprastructure. Source : personnelle.

En effet, afin d'éviter l'accumulation bactérienne à l'origine d'une inflammation gingivale (55), il est admis que les surfaces doivent présenter une rugosité inférieure à $0.2\ \mu\text{m}$, définie comme le seuil au-dessous duquel il n'y a pas d'accroche bactérienne (56). En réalité, les matériaux issus des procédés soustractifs ne sont pas complètement lisses. En effet, la mise en forme du titane par usinage crée des stries dans le matériau d'une rugosité linéaire moyenne comprise entre $0,1\ \mu\text{m}$ et $0.3\ \mu\text{m}$ (57–59) en fonction de l'orientation de la pièce par rapport à la fraise d'usinage. Si la rugosité excède un certain seuil, l'intervention d'un technicien de laboratoire est nécessaire pour atteindre un meilleur état de surface sous la forme d'un « poli-miroir » secondaire à l'usinage.

Comme montré dans le chapitre précédent, le procédé SLM modifie l'état de surface des pièces obtenues. Si cette technique est destinée à obtenir des PPIP, il est pertinent de se demander si l'état de surface brut peut subir un traitement similaire tout en garantissant une réponse biologique comparable à celle retrouvée au contact d'un matériau usiné.

Le but de ce deuxième chapitre est donc d'analyser, après caractérisation de la rugosité de surface, la réponse cellulaire de fibroblastes gingivaux humains sur une surface modifiée par polissage mécanique d'un alliage de titane Ti6Al4V mis en forme par SLM et de la comparer à la réponse cellulaire de fibroblastes gingivaux sur une surface de Ti6Al4V obtenue par usinage. La réponse biologique d'une surface brute SLM a aussi été explorée pour déterminer l'influence que pouvait avoir une surface brute SLM d'élaboration rugueuse sur le comportement des fibroblastes gingivaux.

Référence de la publication :

Crenn MJ, Benoit A, Rohman G, Guilbert T, Fromentin O, AttalJP, Bardet C. Selective laser melted titanium alloy for transgingival components: influence of surface condition on fibroblasts cell behavior. J Prosthodont. 2021. Online ahead of print. DOI:10.1111/jopr.13347.

Selective Laser Melted Titanium Alloy for Transgingival Components: Influence of Surface Condition on Fibroblast Cell Behavior

Marie-Joséphine Crenn, DDS MSc ¹, Aurélie Benoit, PhD,¹ Géraldine Rohman, PhD,²
Thomas Guilbert, PhD,³ Olivier Fromentin, DDS PhD,¹ Jean-Pierre Attal, DDS PhD,¹ & Claire Bardet, PhD⁴

¹URB2I, Université de Paris, Montrouge, France

²Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

³Institut Cochin, Université de Paris, Paris, France

⁴Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies URP2496 and FHU-DDS-Net, Dental School, Université de Paris, Montrouge, France

Keywords

Ti6Al4V; cytocompatibility; micro-topography; selective laser melting; dental prosthesis; additive manufacturing.

Correspondence

Dr. Marie-Joséphine Crenn, Université de Paris, Dental School, Université de Paris, 1 rue Maurice Arnoux, 92120 Montrouge, France. E-mail: marie-josephine.crenn@univ-paris-diderot.fr

Conflict of interest statement: The authors deny any conflicts of interest in regards to the current study.

Accepted February 3, 2021

doi: 10.1111/jopr.13347

Abstract

Purpose: To mechanically characterize and assess the biological properties of Ti6Al4V surfaces obtained by Selective Laser Melting in order to determine whether this process is conceivable for production of implant-supported prostheses and particularly trans-gingival components. As-built and polished surfaces were studied in comparison with components obtained by computer numerical control machining technology in order to consider whether the properties are in the same range as the conventional method currently used.

Materials and Methods: Cylindrical specimens of Ti6Al4V ($n = 6$) were built with Selective Laser Melting for the characterization of mechanical properties according to ISO 22674 and discs ($n = 12$) were fabricated in the same conditions for cytotoxicity evaluation. Discs ($n = 12$) of Ti6Al4V were also obtained by computer numerical control machining as control. Half of the number of discs ($n = 6$) from each process were polished, to simulate the laboratory protocol for polishing of transmucosal components and half of the discs remained unaltered (as-built). Surface roughness measurements of disc specimens (as-built and polished) were compared with computer numerical control milling specimens (as-built and polished). Proliferation of human gingival fibroblasts on Ti6Al4V surfaces was also assessed for each condition. Viability and cell morphology were then evaluated qualitatively. Ra and Sa data were compared using Student's t-test ($\alpha = 0.05$) and metabolic activity data were compared using Kruskal-Wallis statistical test ($\alpha = 0.05$).

Results: Selective Laser Melting specimens showed elongation at break greater than 2% and 0.2% yield strength better than 500MPa which complied with ISO 22674 standards. Although Selective Laser Melting samples displayed significantly increased roughness on as-built surfaces compared to computer numerically controlled milling samples ($p < 0.05$), no statistically significant difference was observed after mechanical polishing ($p = 0.279$). Regarding metabolic activity, no statistical difference was observed between groups at day 3 ($p > 0.05$) and fibroblasts showed a viability higher than 97% on all discs. Cell shapes on polished samples suggested moderate adhesion compared to unpolished samples.

Conclusion: With the manufacturing parameters selected in this study, Selective Laser Melting of Ti6Al4V appeared to be compatible with a prosthetic application type 4 according to ISO 22674. Surfaces obtained, followed by recommended post-processing provided components with equivalent biological properties compared to computer numerical control machining technology.

Due to their high corrosion resistance, excellent mechanical properties and well-known biocompatibility, titanium alloys and particularly Ti6Al4V are conventionally used in dental implant therapy for manufacturing prosthetic components.¹

Most titanium dental restorations have been manufactured so far by casting and computer numerical control milling (CNCM) based on a 3D file format. Nonetheless, in the last decade, additive manufacturing (AM) appears to be a promising alternative because it provides the opportunity to produce fully customizable objects with complex geometries and generates less material waste.² Different categories of additive manufacturing processes have been developed for different types of materials.³ For metallic biomedical applications, selective laser melting (SLM), which consists of producing a solid component fusing fine layers of metal powder by means of a high-power laser beam, is one of the most increasingly used processes for manufacturing dental implants⁴ but also for conventional prosthetic metal components.⁵

Implant-supported prostheses (ISP), either fixed or implant-retained, represent an additional new category of dental prostheses related to the evolution of osseointegrated dental implants.⁶ Depending on the options of treatment, different designs of metallic components exist such as abutments, bars and frameworks. These metallic devices are completely customized for each patient and therefore AM technologies offer an interesting alternative to conventional technologies. However, the surface characteristics of the AM objects cannot ensure a reliable interface between the implant connection and the prosthetic platform.⁷

To date, the combination of the additive process with a further computer numerical control milling is emerging to shape the implant interface and then allow the application of AM technologies for ISP. Although studies have demonstrated clinically acceptable implant abutment-prosthesis discrepancies,⁸ only limited information is available regarding the mechanical and biological performance of Ti6Al4V obtained by SLM for ISP application. In addition, ISP must conform to mechanical requirements to allow the transmission of masticatory forces between the cosmetic material and the underlying implants. Furthermore, because they have a trans-mucosal part in direct contact with gingiva, ISP surfaces must exist in harmony with peri-implant soft-tissue and protect implants from a highly contaminated oral environment.⁹ By modifying microstructure and surface topography, it could be speculated that manufacturing ISP by SLM influences the restoration of function and gingival cell response.

Indeed, it has been shown that the high cooling rate during SLM process generates residual stresses and modifies the microstructure compared to the cast and milled Ti6Al4V.¹⁰ The process also generates internal porosity that impacts mechanical properties.¹¹ To optimize mechanical properties, the manufacturing process must be carefully tuned. Heat treatments are usually performed to improve ductility and fatigue strength by relieving internal stresses and partially restoring microstructure.¹² If SLM alters mechanical and physical behavior, it also modifies chemical properties¹³ and surface topography: the surfaces show a characteristic macroroughness¹⁴ inherent to layer-wise production and the presence of unmolten particles.¹⁵ The parameters that influence surface

roughness include powder size distribution, layer thickness, laser power, scan speed, scan strategy, build orientation and surface postprocessing.¹³

Cell behavior¹⁶ as well as plaque retention depend on surface topography. Subramani *et al*¹⁷ showed that increasing surface roughness (Ra) facilitates biofilm formation on abutment surfaces and leads to the penetration of bacterial plaque into the peri-implant environment. To prevent biofilm formation, ISP surfaces intended to be in direct contact with gingiva or in the transmucosal area are developed with highly polished surfaces. A threshold roughness of 0.2 μm below which no further impact on the bacterial adhesion and/or colonization should be expected.¹⁸

Therefore, this *in vitro* study aimed to study the behavior of gingival cells on Ti6Al4V surfaces obtained by SLM, with and without polishing, in order to validate the SLM process as a conceivable alternative to CNCM technology for building trans-gingival components. First, mechanical properties were evaluated to verify that the SLM specimens obtained with the chosen powder and process parameters fulfilled the minimal requirements according to ISO 22674 standards.¹⁹ Then, after characterizing the surface topography, *in vitro* cellular response of human gingival fibroblasts (HGFs) was assessed on polished and as-built surfaces obtained by SLM compared to conventional CNCM technology. The null hypothesis assumed that HGF response was not affected by the manufacturing process or surface finishing.

Materials and methods

SLM specimens were manufactured with an SLM machine (Truprint 1000, Trumpf) from a titanium alloy powder grade 23 (Ti64-53/20; Tekna Advanced Materials Inc., Sherbrooke, Canada) by a manufacturer (Circle, Biotech Dental) specialized in AM for conventional dental prostheses fabrication. Titanium alloy powder grade 23 is a version of Titanium grade 5 with extra low interstitial components such as oxygen, iron, carbon and nitrogen. The SLM processing parameters were adjusted to a laser power of 125 W, a laser scanning velocity of 905 mm s^{-1} , and a layer thickness of 20 μm . The particle size distribution had an average diameter of $53 \pm 20 \mu\text{m}$ (Fig 1B). Postprocessing was performed according to the manufacturer's instructions in a furnace (N 41/H, Nabertherm) under an Argon gas atmosphere. The first heat treatment was performed at 100°C for 20 min followed by progressive heating from 100°C to 1050°C at a rate of 21°C/min, ending with a plateau at 1050°C for 2 hours. The specimens were finally cooled to room temperature in the furnace.

Computer numerically controlled milled (CNCM) specimens were manufactured with an NC 5-axes milling machine (CORiTEC 350i, Imes-Icore) from a titanium alloy grade 5 metal disc (Cupra Ti-5, Whitepeaks Dental Solutions GmbH, Wesel, Germany) which is currently the titanium commonly used with milling procedure. No postprocessing was performed after milling. The chemical compositions of titanium alloy grade 5 (Cupra Ti-5, Whitepeaks Dental Solutions GmbH, Wesel, Germany) and the titanium alloy powder grade 23 (Ti64-53/20; Tekna Advanced Materials Inc., Sherbrooke, Canada) are given in Figure 1A.

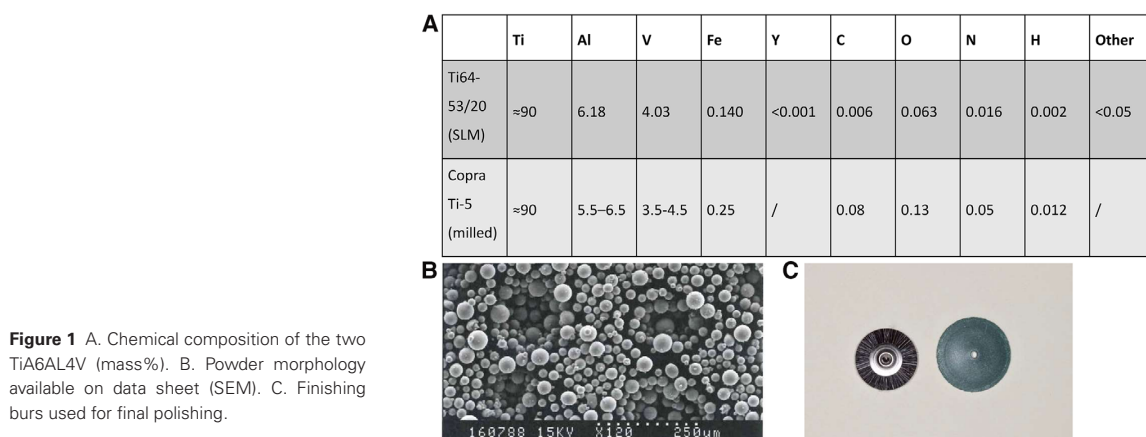


Figure 1 A. Chemical composition of the two Ti6Al4V (mass%). B. Powder morphology available on data sheet (SEM). C. Finishing burs used for final polishing.

For the mechanical investigation, six cylindrical specimens (3 mm diameter, 18 mm gauge length) were fabricated with the SLM process, perpendicularly to the build plate, without surface finishing.

For the cytotoxicity tests, twelve discs (12 mm diameter and 2 mm height) were manufactured with both processes: SLM and CNCM. For the SLM specimens, the build direction was perpendicular to the disc surface. Then, half of the discs of each group were polished, as recommended for prosthetic components in direct contact with gingiva. First, a specific dental bur (Dedeco® no. 4950, Long Eddy, NY) inserted in a dental handpiece with a slow speed ranging from 10,000 rpm to 12,000 rpm was used. Then, a finishing bur (Robinson Polishing Bristle Brushes soft, Buffalo Dental Manufacturing Co Inc, Syosset, NY) combined with universal polishing paste (Dialux Blanc) (Fig 1C) was applied with the same conditions. The mechanical polishing was performed by a dentist specialized in prosthodontics. The other half of the discs was left as built providing four surface conditions: as-built SLM (SLM-AB), mechanically polished SLM (SLM-MP), as-built CNCM (CNCM-AB), mechanically polished CNCM (CNCM-MP).

Tensile tests were conducted on cylinders ($n = 6$), at room temperature, at a crosshead speed of 1 mm/min and using a 12.5 mm gauge length axial extensometer. Young's modulus (E), ultimate tensile strength UTS, 0.2% yield strength (0.2%YS) and elongation at break (A) were measured on stress-strain curves and then compared to ISO 22674 guidelines.

An Alicona InfiniteFocus® optical 3D measurement device was used to assess the surface roughness of SLM-AB, SLM-MP, CNCM-AB and CNCM-MP discs before biological evaluation. For each surface condition, the linear roughness criterion R_a (arithmetical average deviation of a roughness profile) and its corresponding surface criterion S_a (arithmetical average deviation of all surface height values) were measured in three different areas of three discs to consider interspecimen and intra-specimen variabilities. The sample size ($n = 9$ per

group) allows to detect a variation in R_a of 0.2 μm with a statistical power of 0.8 and a significance level of 0.05.

Filtering parameters were determined according to the specifications of the ISO 4288 standards. Scanning electronic microscopy (SEM) images of these surfaces were also obtained (JEOL-JSM 6400) at a 15 kV acceleration voltage without coating.

Quantitative and qualitative analyses of direct cytotoxicity were performed to assess the suitability of the SLM manufacturing process for prosthetic applications compared to the milled one. All discs were sonicated in deionized water for 15 min and sterilized in a dedicated autoclave in accordance with ISO 17664 specifications before the cytotoxicity assay. The cell culture carried out in this study was performed according to the recommendations of the ISO 10993–5:2009 standard.²⁰

HGF cells were isolated and expanded following an established protocol²¹ (IRB 00006477 n°DC-2009-927, *Cellule Bioéthique* DGR1/A5). Monolayer cultures were maintained at 37°C in DMEM medium with 20% of fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Cells were used at the second passage for all experiments.

For the evaluation of metabolic cell activity, all the experiments were performed in triplicate ($n = 3$ per group) on the specimens previously used for roughness assessment. Discs were placed in a 24-well microplate. Negative control wells ($n = 3$) (media and alamarBlue®) and positive control well ($n = 5$) (polyester coverslips, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) were treated identically. A cell suspension of 40,000 cells/100 μL was prepared and an aliquot of 100 μL was added to each sample and cultivated at 37°C with 5% CO_2 for 1 hour to allow attachment. Then, 900 μL of the medium was added into each well. The plate was then cultivated at 37°C with 5% CO_2 for 1 day and 3 days. At the end of each day, 10% of the total volume in the well (100 μL) solution of alamarBlue® assay (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) was added in each well and incubated at 37°C with 5% CO_2 . After 4h of

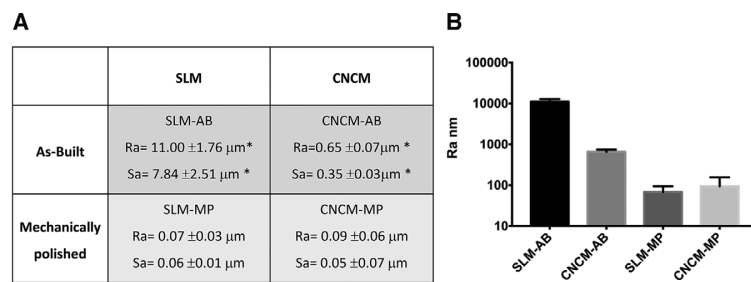


Figure 2 Surface characterization of the four surface conditions. A. Mean $\pm$ SD of Ra and Sa criteria. B. Ra criterion for different surface conditions. Data were analyzed for each line with a Student's t-test (* $p < 0.05$).

incubation, 100 μL samples were transferred in triplicate to a 96-well plate and absorbance was measured at 570 nm and 600 nm wavelengths using a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT). The mean percent reduction was calculated for each well following the manufacturer's instructions, by comparison to the negative control well. The sample size ($n = 3$) was calculated based on a similar study,²² with a statistical power of 0.8 and a significance level of 0.05, where a minimum difference in the rate of reduction of 15% of the alamarBlue reagent was statistically significant.

The viability of fibroblasts was assessed on 1 disc per group using a fluorescence-based LIVE/DEAD[®] assay (Invitrogen, Eugene, OR) at 1 and 3 days respectively ($n = 2$). Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) before staining. The staining solution was mixed at a concentration of 4 μM calcein reagent and 2 μM EthD-1 reagent in 4mL of PBS, determined previously as optimal dye concentrations. For each disc, 300 μL of staining solution was placed inside the same 24-well microplate already used for cell culture for 30 min, in order to cover the disc. Fluorescence images were obtained using an upright wide-field microscope (Olympus BX63 stand coupled with Hamamatsu Flash 4.0LT+ camera controlled by Methamorph 7.8 Software). For each disc, live and dead cells were quantified using ImageJ²³ in six random fields of view at a magnification of 20x for each experimental group.

To observe the postculture morphology at day 10, one disc per group ($n = 1$) was fixed with 2.5% glutaraldehyde (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire UK) and 0.1M Sodium Cacodylate (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) for 30 min and then dehydrated in ethanol/distilled water mixture (gradient 50%-70%-90%, and 100%) with an interval of 10 min each, then dried in air. Cell attachment and morphologies were observed with a scanning electronic microscope (JEOL, JSM-6400) at a 15 kV acceleration voltage after Au-Pt coating (Biorad SC500).

For surface roughness, mean Ra and mean Sa were compared using Student t-test ($\alpha = 0.05$). For cytotoxicity studies, significance was assessed using Prism 7 software (GraphPad v7.0a) with Kruskal-Wallis statistical test since the data were not distributed normally (Kolmogorov-Smirnov test). A p -value less than 0.05 was considered significant.

Table 1 Mechanical properties (Mean $\pm$ SD) of SLM samples compared to the minimum requirements according to ISO 22674

	SLM	Standard ISO 22674 minimum requirements for type 4
Young Modulus E (GPa)	118 $\pm$ 4	/
Ultimate Tensile Strength UTS (MPa)	959 $\pm$ 8	/
Yield Strength 0,2%YS (MPa)	827 $\pm$ 12	0,2%YS > 500MPa
Elongation at break A (%)	4.7 $\pm$ 0.9	A > 2%

Results

Young modulus (E, 118 $\pm$ 4 GPa), ultimate tensile strength (UTS, 959 $\pm$ 8 MPa), 0.2% yield strength (0.2%YS, 827 $\pm$ 12 MPa) and elongation at break (A, 4.7 $\pm$ 0.9%) of Ti6Al4V manufactured by SLM complied with the minimum requirements according to ISO 22674 for devices of type 4 (Table 1). Indeed, elongation at break was higher than 2% and 0.2% yield strength was higher than 500MPa.

SLM-AB samples presented significantly increased roughness ($p < 0.001$) compared to CNCM-AB (11.00 $\pm$ 1.76 μm versus 0.65 $\pm$ 0.07 μm , respectively) (Fig 2). No statistically significant difference was observed between SLM manufactured and CNCM manufactured samples after mechanical polishing ($p = 0.279$). Thus, surface finishing erased the difference in surface topography introduced by the manufacturing process. SEM observations (Fig 3) were consistent with the roughness measurements. The external surface of SLM-AB specimens showed unfused particles and an irregular surface topography related to the powder characteristics and scan parameters. After mechanical polishing, smoother and similar surfaces were obtained from both manufacturing processes.

For each specimen type, mean alamarBlue[®] reduction rates by HGFs were higher at day 3 compared to day 1 ($p < 0.001$),

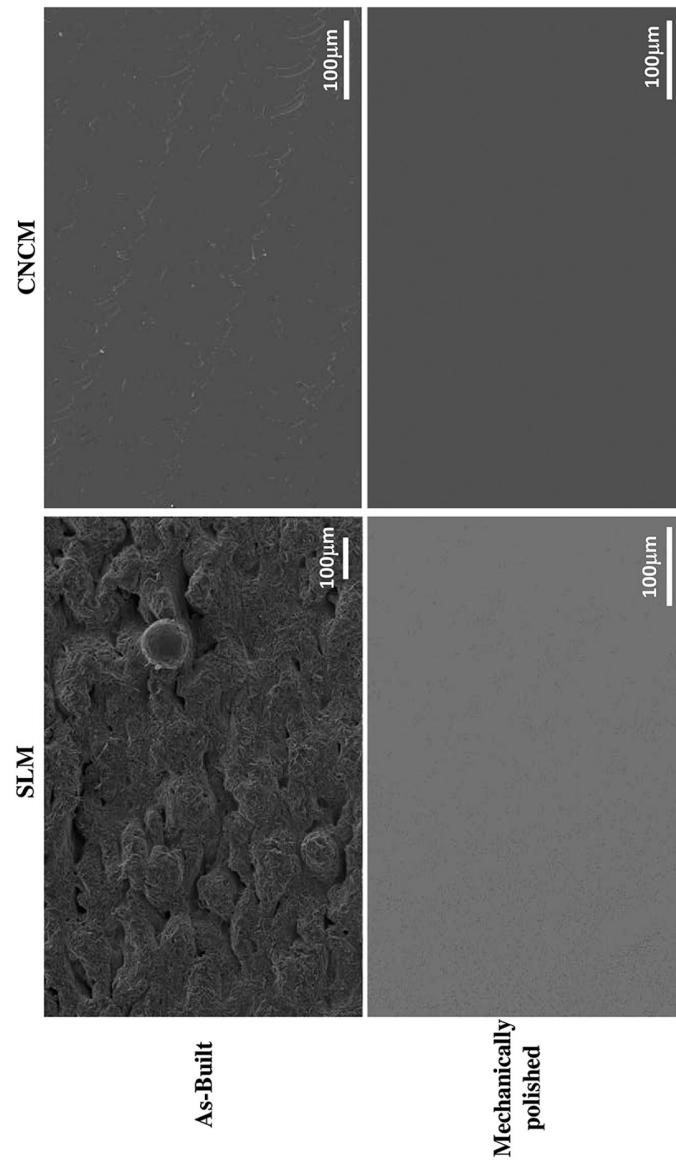


Figure 3 Observations of surface morphology investigated by SEM.

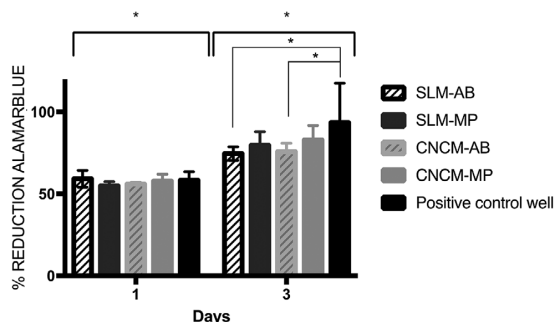


Figure 4 Mean $\pm$ SD reduction of alamarBlue by HGFs seeded on Ti6Al4V discs representative of four surface conditions and on a positive control. Data were analyzed using a Kruskal-Wallis test (* $p < 0.05$).

displaying cell proliferation. No significant difference was observed between any of the groups at day 1 ($5.92 \pm 0.05\%$ for SLM-AB, $5.48 \pm 0.02\%$ for SLM-MP, $5.60 \pm 0.01\%$ for CNCM-AB, $5.79 \pm 0.04\%$ for CNCM-MP and $5.82 \pm 0.05\%$ for positive control discs) (Fig 4). At day 3, metabolic activity decreased for as-built samples compared to positive control ($p = 0.009$ for SLM-AB vs positive control and $p = 0.044$ for CNCM-AB vs positive control) but no statistically significant difference was observed between other groups. The null hypothesis was accepted: there was no difference between HGF activity on specimens processed by SLM and CNCM, before or after MP.

Both CNCM and SLM discs presented HGFs viability higher than 97% (Fig 5). CNCM-MP showed a slightly higher viability than SLM-AB at day 3, 99.59% vs 97.58%, respectively.

At day 10, HGFs presented different morphologies according to sample surfaces (Fig 6).

Cells were elongated in shape, slender and stretched out on mechanically polished surfaces. More lamellipodia were observed on the SLM-AB surfaces, suggesting better adhesion.

Discussion

Although SLM technology is widely used to manufacture dental implants^{24,25} and conventional prosthetic components,^{26–28} limited information is available to determine where SLM process can substitute CNCM system to manufacture ISP.⁷ In the present study, the behavior of fibroblasts on different Ti6Al4V surfaces was compared, in order to consider whether the components obtained by SLM technology exhibited a biological response that is in the same range that conventional CNCM method currently used. The titanium alloy powder grade 23 used in this study presents a low oxygen content²⁹ (0.13% maximum) that confers improved resistance to corrosion, reduce oxidation and optimize mechanical properties, which are main features in medical devices in contact with human fluids such as ISP.³⁰

The evaluation of mechanical properties primarily confirmed that the specimens obtained by the SLM process complied with ISO 22674 type 4 which specifies the required mechanical properties for the fabrication of dental devices. Ductility was

higher than to 2% and 0.2% yield strength was higher than 500 MPa ($4.7 \pm 0.9\%$ and 827 ± 12 MPa, respectively). However, ductility was lower than 8% as required in ASTM 3001 which specifies the minimum mechanical properties of Ti6Al4V manufactured with powder bed fusion. This result demonstrates that the selected process parameters associated with the heat treatment may be sufficient to fabricate dental components of type 4 according to ISO 22674 but further investigations are needed to optimize the process parameters and thermomechanical treatments to guarantee a ductility greater than 8% which is necessary to minimize brittle fractures.³¹

Roughness measurements displayed that the SLM raw surface presented rougher surface compared to the CNCM components. However, mechanical polishing erased the difference in surface topography introduced by the process chosen and allowed reaching a roughness measurement $<0.2 \mu\text{m}$ for both groups.

HGFs proliferated in a statistically similar way after mechanical polishing on surfaces manufactured by both SLM and conventional milling. Interestingly, although CNCM specimens with mechanical polishing (CNCM-MP) showed a slightly higher viability than as-built SLM (SLM-AB) at day 1 and 3, mechanical polishing seemed to have no significant impact on cell proliferation: metabolic activity was similar for all surface conditions. The high survival rate for all groups is correlated with these findings.

Concerning the cytocompatibility of SLM surfaces, recent studies support the results observed in this study. NIH 3T3 mouse embryonic fibroblast cells were viable and proliferated well in vitro at day 7 on SLM surfaces with surface roughness as high as $17.6 \pm 3.7 \mu\text{m}$.³² Chikarakara et al showed in an in vitro study that laser surface melting used as postprocessing with a continuous mode CO₂ laser with different process parameters to manufacture laser treated Ti6Al4V surfaces (average $R_a = 1.8 \mu\text{m}$) increased NIH 3T3 mouse embryonic fibroblast viability compared to untreated titanium surfaces (average $R_a = 0.56 \mu\text{m}$) at day 7.³³ However, the comparison of results between studies is difficult since the surface roughness of SLM pieces differed in each study due to variations in the manufacturing parameters such as initial powder particle size, layer thickness, laser type and scan strategy. This highlights the necessity to optimize process parameters, initial powder characteristics and scan strategy regarding the expected surface topography, material density, and mechanical properties required for ISP for further research.

At day 10, cells were elongated in shape, slender and stretched out on mechanically polished surfaces, but more lamellipodia were observed on the as-built SLM surface, suggesting better adhesion. A possible explanation is that a rougher surface is easier to adhere to than a smooth mechanically polished surface. Recently, Xu et al confirmed this hypothesis and showed that fibroblasts expressed higher amounts of fibronectin and vinculin in vitro on SLM surfaces than on polished surfaces ($R_a = 7.57 \pm 0.32 \mu\text{m}$ versus $R_a = 0.39 \pm 0.01 \mu\text{m}$, respectively).⁴

To date, the scientific literature has shown contradictory results and has not clarified whether it is preferable to have a transgingival portion with controlled roughness or a smooth surface. Previous in vitro studies on gingival epithelial cells

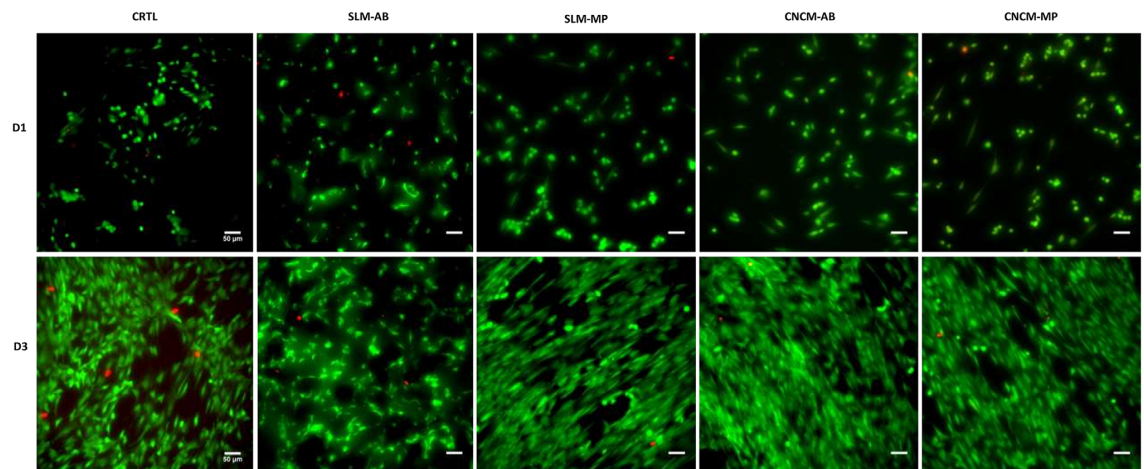


Figure 5 LIVE/DEAD staining images of HGFs cells on the surface of a positive control (CTRL) and of Ti6Al4V discs representative of four surface conditions at day 1 and day 3. Scalebar: 50 µm.

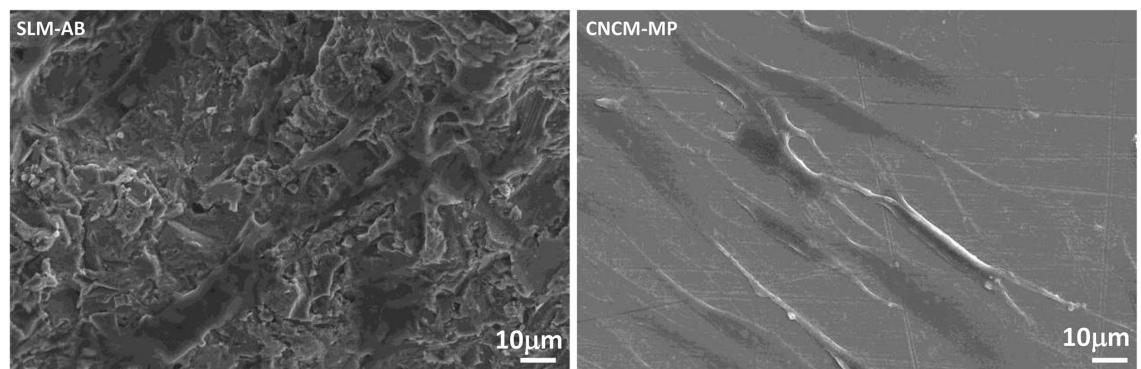


Figure 6 Cell morphology after 10 days on an as-built SLM disc and on a mechanically polished NCM disc.

and fibroblasts showed that cells attached and spread more readily on a smooth polished titanium surface than on a rougher (grit blasted) one.^{34,8} Authors have generally affirmed that a smooth surface also reduces the adhesion of bacteria and decreases the incidence of peri-implantitis. On the other hand, recent *in vivo* short-term data (<6 months) suggest a similar inflammatory response and enhanced connective fiber attachment next to titanium abutments with different modified surfaces (acid etched, laser treated and argon plasma treatment) in comparison with machined surface titanium abutments.³⁵ With regard to SLM, Mangano *et al* identified *in vivo* more integrin and lower inflammation near healing abutments obtained by direct metal laser sintering with a proper roughness (of appropriate size in terms of depth and ridges) and an average $R_a = 66.8 \mu\text{m}$, suggesting the positive behavior of this additive process.³⁶

In the present study, SLM surface with the selected powder and parameters applied provided a viable surface for HGF proliferation, regardless of polishing. However, the processing parameters, the powder characteristics (in terms of chemical composition and particle size distribution) and the postprocessing treatment influence the surface characteristics liable to impact cell response. Different settings remain to be tested to widen this study and support its results. Furthermore, the percent reduction of alamarBlue depends on the metabolic activity of the cell line and the culture protocol. Although this reagent provides accurate time-course measurements, the assessment of cell proliferation through the combination of different assay chemistries could complete the biocompatibility profile of TiAL64V manufactured by SLM. In addition, a quantitative evaluation of the gingiva cell adhesion and the effect of biofilm formation on these AM surfaces should be evaluated to

validate the SLM process as a manufacture way to build ISP in a long-term clinical use.

Conclusion

With the selected powder and applied parameters, Ti6Al4V manufactured by SLM showed biological in vitro properties equivalent to the CNCM method currently used for ISP fabrication and appeared to be compatible with a prosthetic application according to ISO 22674. Despite a limited observation time (3 days), it can be speculated that the SLM process followed by polishing performed before clinical application can be considered for manufacturing ISP in direct contact with gingiva. The results also highlighted that rough surfaces may allow better attachment of gingival cells which is a main issue to enhance soft tissue barrier and create a protective seal between the oral environment and the alveolar bone, preventing the risk of peri-implantitis.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. B. Salmon and Dr G. Jouanny; S. Le Goff from URB2i and Nicolas Roubier for their technical support; and Edentech and Circles4labs for providing specimens.

References

- Wataha JC: Alloys for prosthodontic restorations. *J Prosthet Dent* 2002;87:351-363
- van Noort R: The future of dental devices is digital. *Dent Mater* 2012;28:3-12
- ISO 17296-2, Additive manufacturing - general principles. Part 2: overview of process categories and feedstock. International Organisation for Standardization. 2015
- Xu R, Hu X, Yu X, et al: Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells. *Int J Nanomedicine* 2018;13:5045-5057
- Koutsoukis T, Zinelis S, Eliades G, et al: Selective laser melting technique of Co-Cr dental alloys: a review of structure and properties and comparative analysis with other available techniques. *J Prosthodont* 2015;24:303-312
- Simon H, Yanase RT: Terminology for Implant prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:539-543
- Revilla-Leon M, Sadeghpour M, Ozcan M: A review of the applications of additive manufacturing technologies used to fabricate metals in implant dentistry. *J Prosthodont* 2020;29:1-15
- Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, et al: Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1325-1341
- Sanz-Martín I, Sanz-Sánchez I, Carillo de Albornoz A, et al: Effects of modified abutment characteristics on peri-implant soft tissue health: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Impl Res* 2018;29:118-129
- Benedetti M, Torresani E, Leoni M, et al: The effect of post-sintering treatments on the fatigue and biological behavior of Ti-6Al-4V ELI parts made by selective laser melting. *J Mech Behav Biomed Mater* 2017;71:295-306
- Kasperovich G, Hausmann J: Improvement of fatigue resistance and ductility of TiAl6V4 processes by selective laser melting. *J Mater Process Technol* 2015;220:202-214
- Sallica-Leva E, Caram R, Jardini AL, et al: Ductility improvement due to martensite α' decomposition in porous Ti-6Al-4V parts produced by selective laser melting for orthopedic implants. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;54:149-158
- Vandenbroucke B, Kruth J-P: Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts. *Rapid Prototyp J* 2007;13:196-203
- Chen J, Zhang Z, Chen X, et al: Design and manufacture of customized dental implants by using reverse engineering and selective laser melting technology. *J Prosthet Dent* 2014;112:1088-1095
- Koutiri I, Pessard E, Peyre P, et al: Influence of SLM process parameters on the surface finish, porosity rate and fatigue behavior of as-built Inconel 625 parts. *J Mater Process Technol* 2018;255:536-546
- Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, et al: Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. *Biomaterials* 2012;33:5230-5246
- Subramani K, Jung RE, Molenberg A, et al: Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24:616-626
- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M: Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997;13:258-269
- ISO 22674, Dentistry-Metallic for fixed and removable restorations and appliances. International Organisation for Standardization. 2006
- ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests in vitro for cytotoxicity. International Organisation for Standardization. 2009
- Fournier BPJ, Ferre FC, Couty L, et al: Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* 2010;16:2891-2899
- Springer JC, Harrysson OLA, Marcellin-Little D, et al: In vitro dermal and epidermal cellular response to titanium alloy for implants fabricated with electron beam melting. *Med Eng Phys* 2014;36:1367-1372
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671-675
- Mangano F, Chambrone L, van Noort R, et al: Direct metal laser sintering titanium dental implants: a review of the current literature. *Int J Biomater* 2014;2014:461534
- Oliveira TT, Reis AC: Fabrication of dental implants by the additive manufacturing method: a systematic review. *J Prosthet Dent* 2019;122:270-274
- Takaichi A, Suyalatu, Nakamoto T, et al: Microstructures and mechanical properties of Co-29Cr-6Mo alloy fabricated by selective laser melting process for dental applications. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013;21:67-76
- Kim H, Jang S, Kim Y, et al: Microstructures and mechanical properties of Co-Cr dental alloys fabricated by Three CAD/CAM-based processing techniques. *Materials (Basel)* 2016;9:1-14
- Zhou Y, Li N, Yan J, et al: Comparative analysis of the microstructures and mechanical properties of Co-Cr dental alloys fabricated by different methods. *J Prosthet Dent* 2018;120:617-623

29. Sidambe AT. Biocompatibility of advances manufactured titanium implants – A review. *Materials* (Basel) 2014;7:8168-8188
30. ASTM. ASTM F3001 Standard specification for additive manufacturing titanium- 6 aluminium - 4 vanadium ELI (Extra Low Interstitial) with Powder Bed Fusion. 2014
31. Mish CE: Contemporary Implant Dentistry (ed 3). St Louis, Elsevier, 2008
32. Vaithilingam J, Kilsby S, Goodridge RD, et al: Functionalisation of Ti6Al4V components fabricated using selective laser melting with a bioactive compound. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015;46:52-61
33. Chikarakara E, Fitzpatrick P, Moore E, et al: In vitro fibroblast and pre-osteoblastic cellular responses on laser surface modified Ti-6Al-4V. *Biomed Mater Bristol Engl* 2014;10:015007
34. Hormia M, Könönen M, Kivilahti J, et al: Immunolocalization of proteins specific for adhaerens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *J Periodontol Res* 1991;26:491-497
35. Pesce P, Menini M, Tommasato G, et al: Influence of modified titanium abutment surface on peri-implant soft tissue behaviour: a systematic review of histological findings. *Int J Oral Implantol* 2019;12:419-429
36. Mangano C, Mangano FG, Shibli JA, et al: Immunohistochemical evaluation of peri-implant soft tissues around machined and direct metal laser sintered (DMLS) healing abutments in humans. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15:1-18

II-3 Synthèse et supplementary data

Les conclusions de cette étude montrent que la rugosité de surface n'est pas statistiquement différente entre les pièces obtenues par SLM et les pièces obtenues par usinage après polissage mécanique ($R_a = 68,32\text{nm} \pm 25,76$ vs $93,76 \pm 63,12$). Le procédé de mise en forme n'a donc pas d'effet sur la rugosité de surface après polissage. Concernant les résultats des tests de cytotoxicité directs, à J3, il n'existait pas de différence significative en termes de prolifération entre les fibroblastes cultivés au contact d'une surface obtenue par SLM comparativement à une surface obtenue par usinage, si la surface avait été préalablement polie. Curieusement, comme indiqué dans la discussion, même si l'activité métabolique était légèrement plus faible sur la surface brute SLM à J3, il semblerait que la rugosité de surface joue un rôle sur l'adhésion cellulaire puisque les cellules avaient tendance à adopter une morphologie plus favorable pour accrocher à cette surface qu'au contact d'une surface lisse. Cette tendance était retrouvée sur des images à faible grandissement (Figure 16) où il était possible de voir que sur les disques polis ou usinés, une fois arrivé à confluence, le tapis cellulaire se décrochait à la première manipulation (même si les cellules restaient vivantes) alors que sur les disques SLM bruts, les cellules restaient adhérentes au substrat.

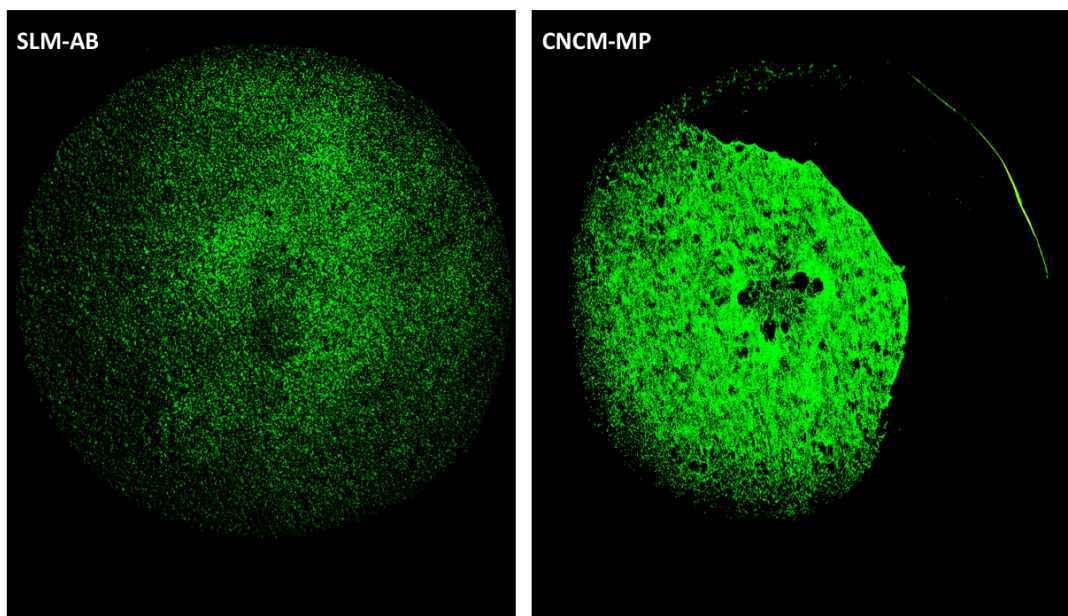


Figure 16 : Supplementary Data. Images au microscope à fluorescence du tapis cellulaire arrivé à confluence sur une surface rugueuse obtenue par SLM à gauche (SLM-AS : SLM As-Built), et sur une surface lisse obtenues par usinage à droite (CNCM-MP : Computer Numerically Controlled Milled – Mechanically Polished).

Comme décrit dans la discussion de l'article présenté ci-dessus, cette rugosité qui s'avère bénéfique pour l'adhésion des fibroblastes gingivaux dans des conditions *in vitro* pourrait être finalement néfaste dans des conditions *in vivo* puisqu'elle faciliterait en premier lieu l'accroche des cellules bactériennes.

Pour tirer avantage de cette rugosité dans des conditions cliniques *in vivo*, il faudrait imaginer une modification de surface qui garantirait, **dès l'insertion du matériau**, une adhésion au profit des cellules humaines et non des cellules bactériennes.

L'enjeu réside alors dans la création d'une surface **avec différentes fonctions** :

- une fonction à court terme, c'est-à-dire dès les premières secondes/minutes, pour favoriser sa reconnaissance par les cellules humaines
- une fonction à moyen et long termes, pour favoriser le développement des mécanismes d'adhésion cellulaire et garantir une véritable accroche des tissus mous péri-implantaires dans le temps.

Ces hypothèses ouvrent la voie à de nouvelles pistes de réflexions et s'inscrivent dans le débat actuel en rapport avec l'optimisation de l'état de surface du composant transgingival.

II-4 L'optimisation de l'état de surface du composant transgingival

Pour rappel, les tissus péri-implantaires se présentent sous la forme d'une muqueuse péri-implantaire remaniée formant un tissu cicatriciel « scellé » et non attachée à la surface du composant transgingival, contrairement à la dent naturelle (Figure 17).

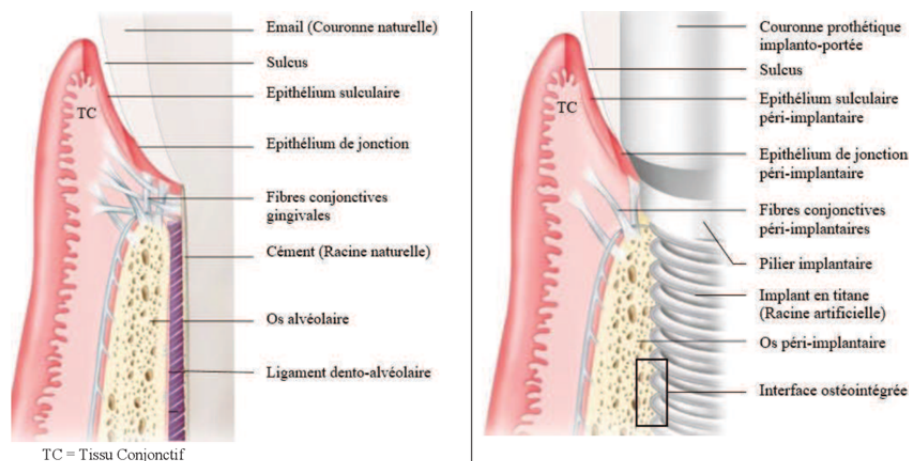


Figure 17 : Différence entre la situation des tissus parodontaux au niveau d'une dent et celle des tissus mous péri implantaires au niveau du composant transgingival ; d'après Bouchard et al. 2015 (60).

S'il est possible de noter quelques similarités anatomiques, ces deux tissus présentent des différences histologiques. Brièvement, au niveau de l'épithélium de jonction péri-implantaire, la quantité d'hémidesmosomes (HD), structures de jonction essentielles pour l'adhésion des cellules épithéliales à la surface d'un biomatériau, est réduite. De plus, ces HD se situent essentiellement dans la partie apicale de l'épithélium de jonction autour d'un implant, alors qu'ils sont distribués de façon plus homogène autour d'une dent naturelle. En ce qui concerne le tissu conjonctif péri-implantaire, des fibroblastes sont localisés à proximité de la surface du composant transgingival mais la vascularisation y est très faible ainsi que le nombre de fibres de collagène. L'orientation de ces dernières se fait parallèlement à la surface du composant transgingival alors qu'au niveau dentaire, elles sont orientées perpendiculairement à la surface du ciment et véritablement ancrées dans ce dernier. Le tissu conjonctif n'est donc pas ancré à la surface du matériau. La pénétration des enzymes bactériennes vers les tissus sous-jacents est facilitée par rapport à celle permise par le système d'attache autour d'une dent naturelle.

Conformément aux résultats de l'article présenté ci-dessus, plusieurs équipes de recherche ont rapporté que dans certaines conditions expérimentales particulières, un certain niveau de rugosité pouvait éventuellement être une solution pour améliorer l'intégration des tissus mous péri-implantaires à la surface du composant transgingival. Actuellement, **un débat existe autour de la supériorité des surfaces « lisses » par rapport aux surfaces « rugueuses »** quant à la « muco-intégration » par opposition à l'ostéointégration.

Les chercheurs se sont alors intéressés aux modifications qui pouvaient être apportées à la surface du composant transgingival pour induire une attache épithéliale et conjonctive similaires à celle que l'on trouve sur une dent naturelle (61–64). Différents procédés ont été proposés, reposant sur des modifications mécaniques, chimiques, électro-chimiques et physiques (65). Parmi ces modifications, celles qui conduisent à une surface nanostructurée sur les alliages de titane par **anodisation** suscitent un intérêt particulier. En effet cette technique qui permet d'obtenir une surface organisée nanotubulaire ou nanoporeuse s'avère prometteuse quant à la réponse biologique des cellules gingivales mais également quant à leurs propriétés anti-bactérienne (66,67). Plusieurs équipes ont également montré que ces surfaces nanotubulaires ou nanoporeuses pouvaient être « fonctionnalisées », c'est-à-dire modifiée par

l'adjonction d'entités biologiques (comme des facteurs de croissance ou des nanoparticules), optimisant ainsi les phénomènes d'adhésion entre la surface et les cellules humaines.

Pour toutes ces raisons, et surtout pour améliorer l'accroche des cellules gingivales au composant transgingival, l'anodisation pourrait être une modification intéressante des surfaces de Ti6Al4V obtenues par SLM.

Cependant il reste très difficile de comprendre le réel impact d'une telle surface sur les cellules gingivales et il n'existe à ce jour aucune revue systématique de la littérature ou de méta-analyse qui propose une synthèse des données scientifiques spécifiquement sur cette thématique.

Ainsi, le but de ce troisième et dernier chapitre est de 1) comprendre à travers une analyse systématisée de la littérature comment ces surfaces de titane anodisées vont influencer le comportement des cellules gingivales et 2) synthétiser puis caractériser une surface nanotubulaires de Ti6Al4V obtenue par SLM afin d'envisager la faisabilité d'une telle modification et surtout comprendre son intérêt à l'échelle nanométrique.

Chapitre 3. Modification électrochimique de la surface d'un alliage de titane obtenu par SLM

Ce chapitre débutera par la description du procédé d'**oxydation anodique** du titane. Ensuite, pour resituer le contexte, une revue systématique de la littérature consistera à analyser, à travers la littérature scientifique de ces dix dernières années, l'influence des caractéristiques morphologiques et physico-chimiques des nanopores (NP) et nanotubes (NT) présents à la surface du titane anodisé sur l'adhésion des cellules gingivales. Enfin, une dernière partie sera consacrée à l'élaboration et à la caractérisation à la fois morphologique et physico-chimique d'une surface de Ti6Al4V obtenue par SLM puis modifiée par anodisation.

III-1 L'anodisation : Principes et paramètres

L'anodisation ou oxydation anodique est un processus électrochimique de traitement de surface qui permet d'augmenter l'épaisseur de la couche d'oxyde à la surface d'un matériau. Cette technique, vieille d'un siècle, est largement utilisée dans l'industrie pour la protection des métaux, et est connue du grand public en bijouterie pour colorer les surfaces en titane. Depuis quelques années, cette méthode est également proposée en odontologie pour venir modifier la couleur des piliers prothétiques supra-implantaires (Figure 18) afin d'optimiser le résultat esthétique (68).



Figure 18 : Pilier présentant un revêtement anodisé (XealMD). Source: Nobel Biocare.

En effet, en faisant varier l'épaisseur de la couche d'oxyde, l'anodisation influence les phénomènes d'interférences optiques à la surface du matériau. Plusieurs couleurs peuvent être ainsi obtenues comme le bleu, le doré, le rosé ou le vert (Figure 19).

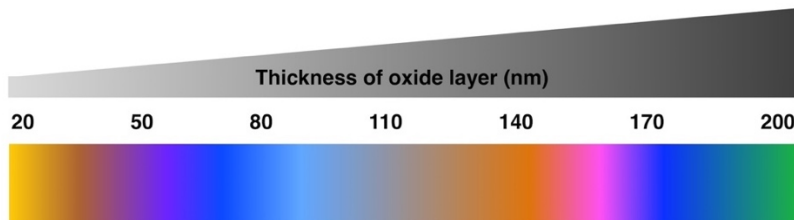


Figure 19 : Couleurs du titane en fonction de l'épaisseur de la couche d'oxyde. Source : Balbachdamast, 2021.

Dans certaines conditions particulières, l'anodisation permet d'obtenir une surface nanostructurée, nanoporeuse (c'est-à-dire présentant simplement un relief type « pore » à l'échelle nanométrique), ou parfois nanotubulaire avec la création de véritable « tubes » dénommés « nanotubes » (NT) (Figure 20).

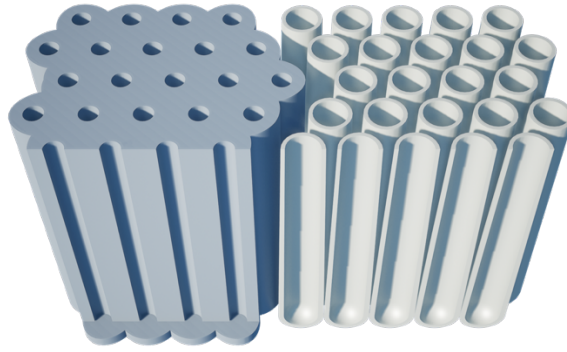


Figure 20 : Schéma présentant des nanopores NP (à gauche) et des nanotubes NT (à droite) de Ti6Al4V.

Les surfaces ainsi obtenues sont utilisées dans de nombreux domaines comme par exemple, des applications électroniques ou des applications médicales, notamment en odontologie.

III-1-1 Description du procédé

Les premiers travaux qui ont permis l'obtention de nanotubes ordonnés sur une couche de titane sont ceux de Zwilling et al. en 1999 (69) puis ceux de Gong et al. en 2001 (70). Classiquement, la technique est réalisée dans une cellule électrochimique à deux électrodes (Figure 21). L'anode en titane et la cathode en platine sont plongées dans un électrolyte dont la composition chimique peut varier. Une tension est appliquée à l'ensemble du système. Le plus souvent, l'électrolyte est maintenu en agitation constante afin de conserver une température et une densité de courant uniformes le long de la surface du titane.

Différents électrolytes ont été étudiés mais la présence d'ions fluorure est toujours indispensable pour permettre la production de nanotubes.

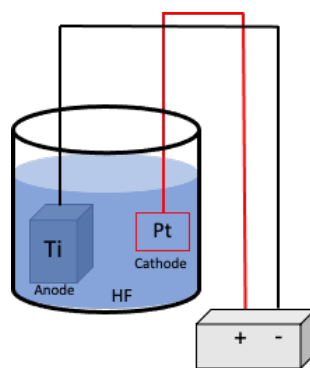
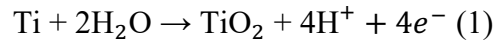


Figure 21 : Schéma simplifié d'une cellule électrochimique pour une oxydation anodique.

III-1-2 Mécanisme de formation des NT

Avant l'anodisation, la formation d'une couche compacte de TiO_2 d'environ 4 à 5 nm s'effectue naturellement à la surface du titane (couche de passivation). Si une tension constante est appliquée dans un électrolyte sans ions fluor, cette couche d'oxyde va croître. La croissance repose sur la diffusion des espèces O^{2-} et Ti^{4+} à travers la couche d'oxyde grâce à la présence d'un champ électrique (Figure 22.A). Les ions O^{2-} (issus de la déprotonation de H_2O) migrent

à travers l'oxyde jusqu'à l'interface métal/oxyde pour réagir avec Ti et Ti^{4+} et former cette couche dense et stable de TiO_2 . L'ion Ti^{4+} migre quant à lui dans le sens opposé, c'est-à-dire vers l'interface oxyde/électrolyte soit pour être solvato et dissout dans l'électrolyte soit pour former un oxyde de titane à la surface suivant l'équation (1).



Sans ions fluor, ce processus serait limité car la couche d'oxyde n'est pas très conductrice et le champ électrique ne suffirait pas pour que la migration des espèces perdure. Une mince couche d'oxyde d'épaisseur limitée appelée couche de passivation serait alors obtenue. Cependant, en présence d'ions fluor, des petits puits se forment aléatoirement sur la couche de TiO_2 . En effet les ions fluor ont la capacité de migrer à travers la couche d'oxyde jusqu'à l'interface métal/oxyde pour réagir avec TiO_2 et former le complexe $[TiF_6]^{2-}$ qui est très soluble dans l'eau et donc dans l'électrolyte (Figure 22).

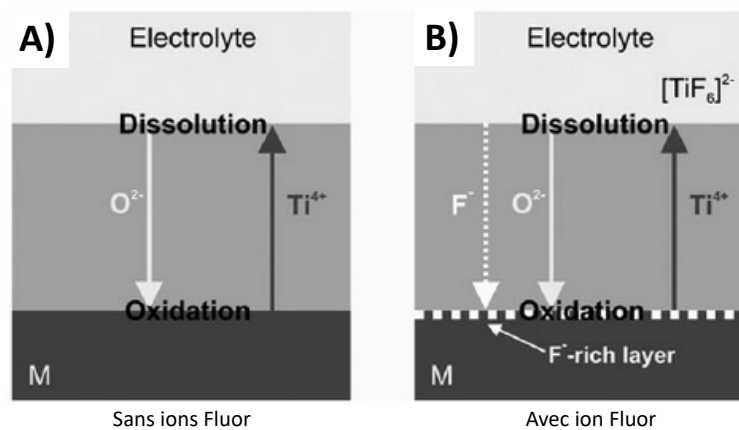
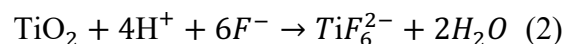


Figure 22 : Migration des espèces lors de l'anodisation d'après Poulomi et al. 2011 (71). A) Migration des espèces chargées sans fluor. B) Migration des espèces chargées avec fluor. Les ions F^- ont la capacité de migrer à travers la couche d'oxyde jusqu'à l'interface métal/oxyde. Il se forme un complexe $[TiF_6]^{2-}$ soluble dans l'eau. Cette migration rapide conduit à la présence à l'accumulation de F^- à l'interface.

Plus simplement, la croissance des NT résulte alors d'une compétition entre la formation anodique de l'oxyde (réaction 1) et sa dissolution chimique en un complexe soluble de fluorure de titane (réaction 2).



Cette dissolution chimique se fait grâce à l'action des ions fluor présents dans la solution mais également grâce à la présence d'ions H^+ générés par la réaction (1). Ces ions H^+ provoquent en plus une diminution locale du pH entre le fond des pores et le sommet, ce qui accélère la redissolution selon l'équation (2).

Même si le processus de formation en tant que tel est encore mal compris, il est admis que la compétition entre les réactions (1) et (2) conduit à la formation de NT de TiO_2 ordonnés verticalement par rapport à la surface (Figure 23).

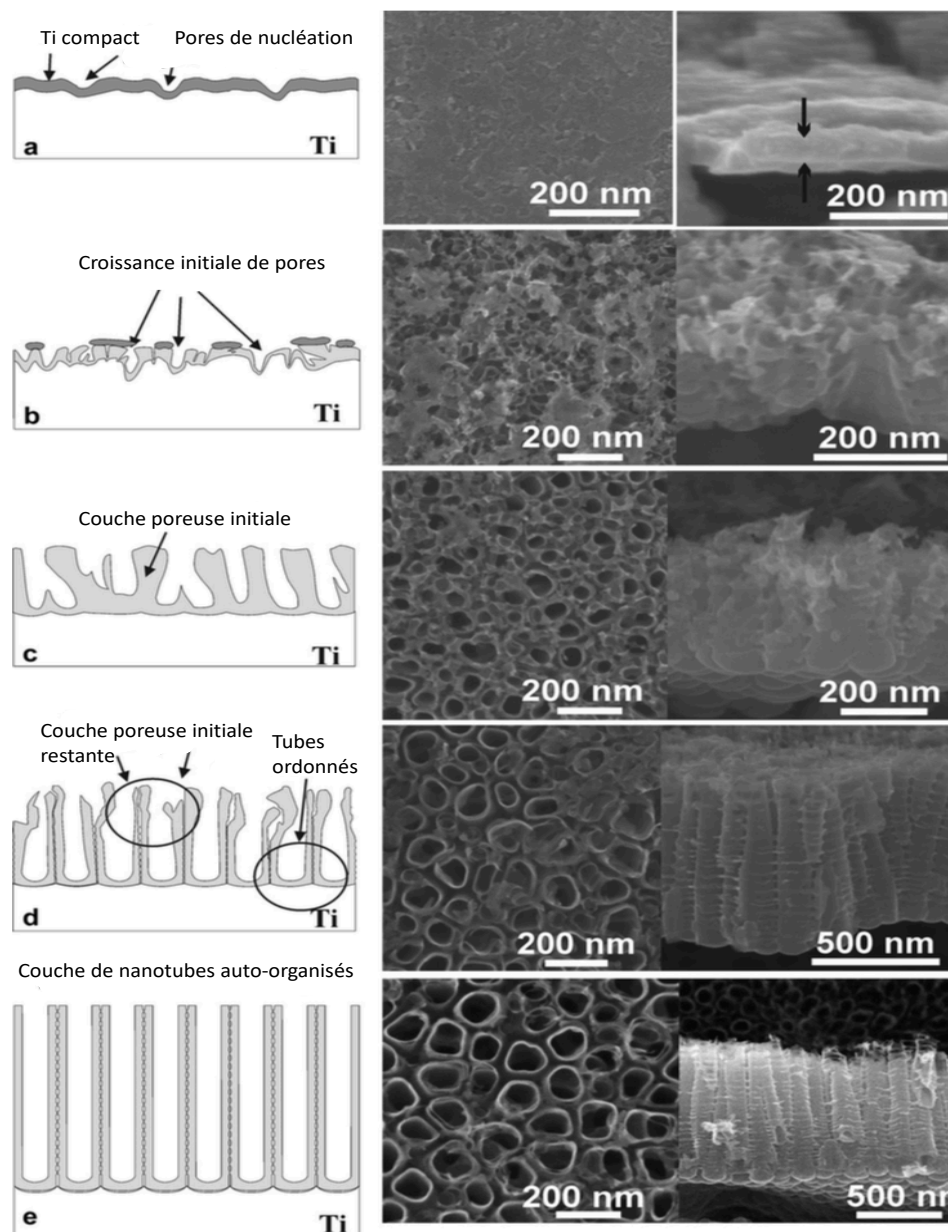


Figure 23 : Les différentes étapes pour permettre la croissance des NT d'après Macak et al. 2008 (72). À gauche, représentation schématique et à droite images de MEB associée vue du haut et en vue transversale. Le processus a été arrêté à 0 min (a), 3 min (b), 10 min (c), 30 min (d) et 1 h (e).

III-1-3 Les facteurs influençant la morphologie/croissance des NT/NP

Les caractéristiques morphologiques des NT/NP (diamètre, longueur et épaisseur des parois) dépendent des conditions expérimentales appliquées pendant l'anodisation.

Les principaux paramètres d'élaboration :

- La durée
- La tension
- La composition de l'électrolyte
- La température

La durée d'anodisation

Dans le cas de l'anodisation du titane en l'absence d'ion fluor, le courant décroît exponentiellement à mesure que la couche d'oxyde s'épaissit.

La croissance du film suit alors la loi suivante :

$$I = A \exp\left(B \times \frac{\Delta U}{d}\right)$$

Où I est le courant, ΔU est la différence de potentiel à travers l'oxyde, d est l'épaisseur de la couche et A et B sont des constantes expérimentales.

La courbe de densité de courant en fonction du temps est alors caractéristique d'une courbe exponentielle décroissante (Figure 24, courbe a). En revanche, en présence d'ions fluor capables de se dissoudre dans la couche d'oxyde, la courbe comprend trois régions caractéristiques : I, II et III (Figure 24, courbe b).

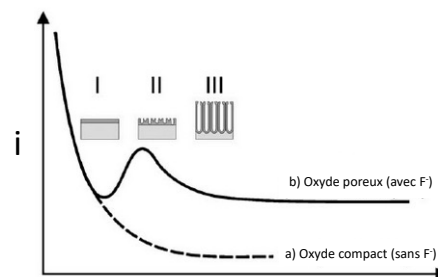


Figure 24 : Courbes courant-temps caractéristiques de l'anodisation sans fluor (a) et avec fluor (b) (71).

Dans la partie I, la couche d'oxyde s'épaissit et se conduit comme une barrière protectrice. La courbe suit alors la même allure que la courbe a), c'est-à-dire qu'il y a une diminution exponentielle du courant (augmentation de la résistance électrique). Seulement, les ions fluorures commencent à dissoudre cette couche d'oxyde aléatoirement, ce qui entraîne une augmentation de l'aire active et donc une élévation du courant (partie II). Le courant est ensuite distribué équitablement au niveau de la surface et il devient constant (partie III). La formation d'un réseau de nanotubes ordonnés se déroule quand le régime stationnaire est atteint, c'est-à-dire quand la vitesse de croissance de l'oxyde est égale à sa vitesse de dissolution. Une fois ce régime atteint et stabilisé, l'épaisseur de la couche nanotubulaire se stabilise également. Si le temps d'anodisation est trop court pour atteindre ce régime stationnaire, les nanotubes créés sont irréguliers.

La tension d'anodisation

Un des paramètres majeurs de l'anodisation est la tension appliquée. En effet, la tension d'anodisation va jouer un rôle très important sur le diamètre des nanotubes. Il existe une relation proportionnelle entre la tension et le diamètre des nanotubes qui peut être décrite selon l'équation : $d = k \times V$ (73) (Figure 25).

Avec la constante $k = 2 \times 10^{-8}$ nm/V, où k désigne le facteur de croissance de la couche d'oxyde qui est égal à 2.5 nm/V pour le TiO_2 , d comme diamètre des nanotubes et V comme potentiel d'anodisation.

$$d = k \times V$$

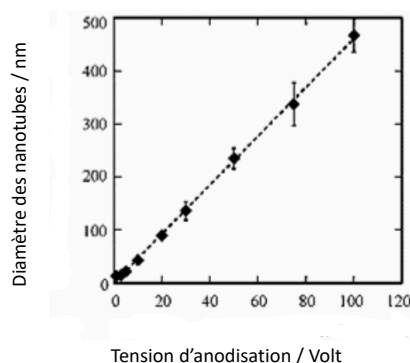


Figure 25 : Variation du diamètre des NT en fonction de la tension d'anodisation ; d'après Macak et al. 2008 (72).

La composition de l'électrolyte

L'électrolyte peut varier dans sa composition chimique et dans sa concentration en ions fluor. Cette variation influence les caractéristiques morphologiques des NT et principalement l'épaisseur de la couche. Plusieurs « générations » de NT ont vu le jour en fonction de la composition de l'électrolyte.

La première génération de nanotubes de titane a été élaborée dans des électrolytes aqueux contenant de l'acide fluorhydrique (HF) seul ou mélangé à d'autres acides. Les NT ainsi obtenus sont plutôt courts (500 à 600 nm de long) et peu ordonnés.

La deuxième génération de nanotubes a été obtenue avec des électrolytes contenant du fluorure de sodium (NaF) ou du fluorure d'ammonium (NH₄F) à la place de l'acide fluorhydrique. Les NT créés atteignent alors des longueurs supérieures à 2 µm.

La troisième génération de nanotubes a été obtenue en ajoutant des solvants organiques (comme l'éthylène glycol ou le glycérol) qui présentent la caractéristique de rendre le bain visqueux, ce qui ralentit la diffusion des espèces ioniques à l'interface métal-électrolyte. En diminuant la diffusion à l'interface métal-électrolyte, les nanotubes obtenus ont des longueurs qui peuvent atteindre 7 µm mais leurs diamètres restent réduits.

D'autres paramètres expérimentaux influencent l'architecture des NT, comme le pH de l'électrolyte ou la température du bain. Les pré traitements ou post traitements (par exemple thermiques ou mécaniques) qui peuvent être appliqués aux pièces avant et après anodisation peuvent quant à eux modifier la cristallinité de la couche de TiO₂.

Enfin, des paramètres propres à la nature physico-chimique du substrat, c'est-à-dire à l'échantillon, et non au protocole ont été décrit comme pouvant influencer la morphologie ou même la présence de NT. Ces paramètres, comme la composition chimique des phases métalliques présentes ou l'orientation cristallographique de la maille élémentaire seront le sujet de la partie III-3.

III-2 Revue de la littérature : « Influence des surfaces anodisées sur le comportement des cellules gingivales : revue systématique d'études *in vitro* »

Cette technique de modification de surface qu'est l'anodisation a été initialement appliquée en odontologie pour améliorer les phénomènes d'ostéo intégration au niveau de la surface implantaire.

Les études rapportent que l'anodisation de la surface implantaire permet une « ostéo-intégration précoce » et une stabilité osseuse (74,75).

Depuis une dizaine d'années, il a été envisagé d'appliquer cette technique pour modifier la surface des composants transgingivaux pour améliorer la réponse des cellules gingivales. La figure 26 schématise une cellule fibroblastique au contact d'une surface présentant des NT.

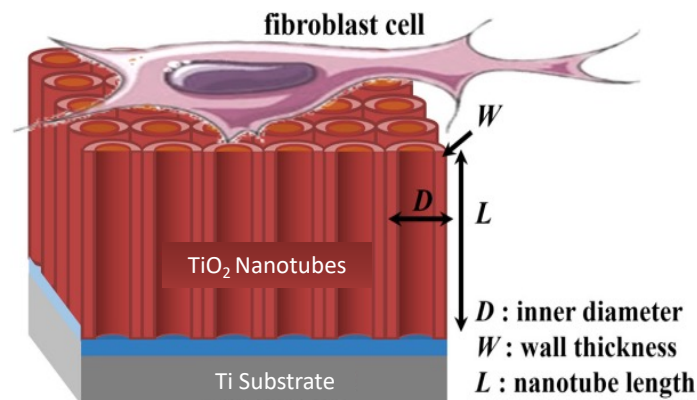


Figure 26 : Représentation schématique d'une cellule gingivale au contact d'une surface nanostructurée ; adaptée d'après Zeng et al. 2017 (76).

Ainsi l'article suivant consiste à analyser, à travers la littérature scientifique, l'influence des caractéristiques morphologiques et physico-chimiques des NP et NT présents à la surface du titane anodisé sur l'adhésion des cellules gingivales. Le but est de I) faire le bilan des protocoles proposés dans les études *in vitro* ces dix dernières années, II) comparer le comportement cellulaire et plus précisément l'adhésion des cellules gingivales face aux différents états de surface retrouvés dans ces études

Référence de la publication:

Crenn MJ; Dubot P; Mimran E; Fromentin O; Lebon N; Peyre P. Influence of Anodized Titanium Surfaces on the Behavior of Gingival Cells in Contact with: A Systematic Review of In Vitro Studies. Crystals 2021, 11, 1566. [https:// doi.org/10.3390/cryst11121566](https://doi.org/10.3390/cryst11121566).

Systematic Review

Influence of Anodized Titanium Surfaces on the Behavior of Gingival Cells in Contact with: A Systematic Review of In Vitro Studies

Marie-Joséphine Crenn ^{1,2,*}, Pierre Dubot ³, Elie Mimran ², Olivier Fromentin ², Nicolas Lebon ⁴  and Patrice Peyre ¹

¹ CNRS-Arts et Métiers ParisTech UMR 8006, Laboratoire Procédés et Ingénierie en Mécanique et Matériaux (PIMM), 75013 Paris, France; patrice.peyre@ensam.eu

² UFR d'Odontologie Garancière, Université de Paris, 75006 Paris, France; eliemimran@gmail.com (E.M.); olivier.fromentin@univ-paris-diderot.fr (O.F.)

³ Institut de Chimie et des Matériaux de Paris-Est (ICMPE), CNRS-Université Paris-Est UMR 7182, 94320 Thiais, France; pdubot@glvt-cnrs.fr

⁴ UR 4462, Unité de Recherche en Biomatériaux Innovants et Interfaces (URB2i), 92120 Montrouge, France; lebon@univ-paris13.fr

* Correspondence: marie-josephine.crenn@univ-paris-diderot.fr



Citation: Crenn, M.-J.; Dubot, P.; Mimran, E.; Fromentin, O.; Lebon, N.; Peyre, P. Influence of Anodized Titanium Surfaces on the Behavior of Gingival Cells in Contact with: A Systematic Review of In Vitro Studies. *Crystals* **2021**, *11*, 1566. <https://doi.org/10.3390/cryst11121566>

Academic Editor: Abel Moreno

Received: 12 November 2021

Accepted: 11 December 2021

Published: 15 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Electrochemically anodized (EA) surfaces promise enhanced biological properties and may be a solution to ensure a seal between peri-implant soft tissues and dental transmucosal components. However, the interaction between the modified nano-structured surface and the gingival cells needs further investigation. The aim of this systematic review is to analyze the biological response of gingival cells to EA titanium surfaces in in vitro studies with a score-based reliability assessment. A protocol aimed at answering the following focused question was developed: “How does the surface integrity (e.g., topography and chemistry) of EA titanium influence gingival cell response in in vitro studies?”. A search in three computer databases was performed using keywords. A quality assessment of the studies selected was performed using the SciRAP method. A total of 14 articles were selected from the 216 eligible papers. The mean reporting and the mean methodologic quality SciRAP scores were $87.7 \pm 7.7/100$ and $77.8 \pm 7.8/100$, respectively. Within the limitation of this review based on in vitro studies, it can be safely speculated that EA surfaces with optimal chemical and morphological characteristics enhance gingival fibroblast response compared to conventional titanium surfaces. When EA is combined with functionalization, it also positively influences gingival epithelial cell behavior.

Keywords: dental abutment; anodic oxidation; titanium; TiO₂ nanotubes; human gingival fibroblasts

1. Introduction

Soft tissue integration is currently a major challenge in implant-prosthetic treatment. Although during the last decade, osseointegration has been the major topic of interest in enhancing the implant survival rate [1], recently, attention has shifted to the barrier formed between the soft tissues and the surface of the transmucosal component. Indeed, stabilizing the connective tissue and the epithelial attachment on the abutment surface (in the case of a bone-level implant) or on the implant neck (in the case of a tissue-level implant) is now considered as the key to safeguarding the implant from bacterial contamination and thus reducing the risk of peri-implantitis [2]. Further techniques have been proposed to promote the surface bioactivity of Ti surfaces, such as mechanical modifications (sandblasting, acid-etching, micro-grooving), physical modification (laser), chemical modifications, and biological coating (proteins, collagen, hydroxyapatite, nanoparticles). Among these modifications, nano-engineered surfaces have gained interest by mimicking the extracellular matrix substrates. Several methods have been described to obtain a nanotextured

surface, but electrochemical anodization or anodic oxidation is considered the most popular cost-effective approach to creating a nano-structured TiO_2 oxide layer [3]. This technique, which consists of the immersion of the target piece in an appropriate electrolyte, was shown to establish a specific nano-structured surface due to the current created between the target metallic piece (anode) and another metal (cathode) through the application of a voltage (Figure 1).

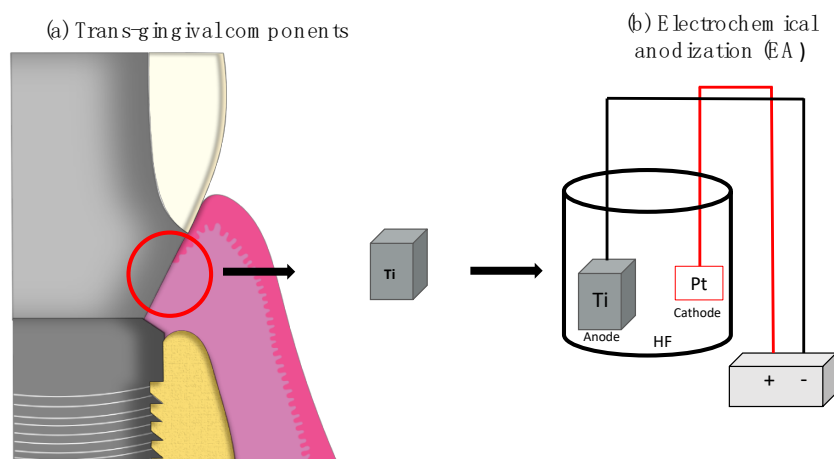


Figure 1. Schematic representation of (a) the trans-gingival abutment-mucosa interface and (b) the electrochemical anodization step to fabricate TiO_2 nanotubes or nanopores.

This specific nano-featured surface is characterized by the presence of nanopores (NP) or nanotubes (NT) whose morphology (diameter, length, wall thickness) and surface chemistry (crystallinity) vary according to the experimental conditions [4] (Figure 2).

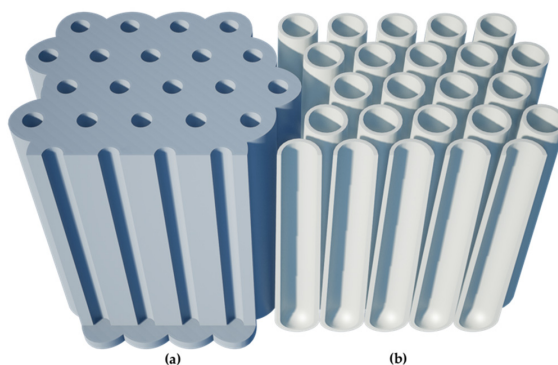


Figure 2. Schematic representation of (a) of nanopores NP and (b) nanotubes.

It is well known that cell behavior is sensitive to surface characteristics such as chemical and physical features [5] and to surface topography and surface reactivity, also EA seems to enhance fibroblast/epithelial response and cell functions. This trend was highlighted by the first in vitro studies investigating fibroblast and epithelial cell response on anodized titanium surfaces [1,6]. However, due to the lack of reproducibility, it remains very difficult to understand the real impact of these surface characteristics on the soft tissue's response. Although in vitro studies cannot explain the complex interactions which occur in the human body, it remains an interesting investigation since it allows precise understanding of the influence of one parameter on a cell line.

The purpose of this systematic review is to investigate, with a score-based reliability evaluation, how the surface properties of anodized titanium surfaces influence the cellular response of gingival cells, in order to enrich the discussion of existing literature about the optimization of such surfaces for trans-gingival components.

2. Materials and Methods

2.1. Protocol

The present systematic review is reported in accordance with the guidelines of Transparent Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA statement) [7].

The focusing question was: “How does the surface integrity (such as topography and chemistry) of the anodized titanium influence the cellular response of gingival cells in in vitro studies?”.

A detailed protocol following the PICO (Population-Intervention-Comparison and Outcomes) strategy was designed to answer this question.

- Population: In vitro studies analyzing fibroblastic and epithelial cell response (since they are both the main resident cell populations in the peri-implant connective attachment) to different electrochemical anodized (EA) titanium surfaces.
- Intervention: Surface modification, known as “anodic oxidation”, which creates a nanofeature surface.
- Comparison: Titanium surfaces obtained in the same conditions as the treated on, but without EA.
- Outcomes: Cellular response with a minimum requirement of a qualitative and/or quantitative adhesion evaluation.

The inclusion criteria were:

- In vitro studies.
- Studies investigating gingival fibroblasts and epithelial cell response to anodized titanium surfaces with nanotubes or nanopores.
- Studies including in their protocol any supplementary modifications previous EA or following EA.

The following studies were excluded:

- Studies proposing a surface modification protocol other than anodic oxidation on a titanium alloy.
- Studies investigating the response of cells different from fibroblasts and epithelial cells (e.g., osteoblasts or bacterial cells).
- Studies investigating soft tissue response in vivo.
- Anodization protocol that does not induce a nanopore or nanotube type nano-structured surface.
- Studies that do not detail the anodization parameters.
- Studies without qualitative or quantitative assessment of cell adhesion/attachment.
- Studies that did not provide information on the morphology of nanotubes/nanopores.

2.2. Search Strategy

An electronic restricted search of studies published only between 1 January 2011 and 31 December 2020 in three databases (MEDLINE/Pubmed, EMBASE, and Web of Sciences) was performed using keywords related to anodization on titanium surfaces combined with keywords related to soft tissues with AND/OR as Boolean operators. This equation was structured as shown in Table 1. No limits were applied regarding the sample size, but only articles written in English were selected.

Table 1. Search strategy and keywords.

(1) "anodic oxidation" OR "surface modification*" OR "modified surface*" OR "anodization" OR "nano topography" OR "anodized" OR "nanotube"
(2) "abutment*" OR "dental abutment*" OR "dental implant"
(3) "fibroblast*" OR "human gingival fibroblast*" OR "gingival cell*" OR "peri-implant soft tissue*" OR "gingival epithelial cell"
(4) "titanium" OR "titanium alloy*" OR "Ti6Al4V"
(5) "Zirconia" OR "Zirconium"
1 AND 2 AND 3 AND 4 NOT 5

The results of the electronic research were imported into software (Excel, Microsoft) to exclude duplicates. Titles and abstracts were screened by two independent reviewers (MJC and EM). Irrelevant studies unrelated to the response of gingival soft tissues on anodized nano-structured titanium surfaces were excluded. In case of difference, a consensus was decided by a supervisor (OF). To improve the sensitivity of the search, the references of all the papers included in the systematic review were checked to potentially reveal additional studies. Then, the full texts of all potentially eligible papers were assessed according to inclusion criteria. The inclusion or exclusion of studies was decided independently by the two reviewers (MJC and EM). In case of difference, a consensus was also decided by the supervisor (OF).

2.3. Data Extraction and Analysis

Data were extracted independently by the two reviewers using two tables specifically developed for this purpose. The first table included the article title and year of publication, sample preparation (materials, fabricant, and anodization parameters), and biological evaluation (measuring variables, methodology, cell density, duration, and number of replicates). The second table presented the characteristics of the different surfaces (surface roughness, NT/NP morphology, and wettability) and the biological results compared to the control surface.

2.4. Quality Assessment of Individual Studies

As described in Corvino et al., 2020 [1], a quality assessment of the selected studies was performed following the SciRAP method (<http://www.scirap.org>, accessed on 1 September 2021). Briefly, SciRAP is a webtool method developed to evaluate both the reliability and the relevance of in vitro studies. Regarding reliability, the criteria used to evaluate "reporting quality" (n = 23) and "methodological quality" (n = 15) separately can be adopted in the evaluation of studies focusing on the cellular response on biomaterials. However, the criteria (n = 4) used for the evaluation of relevance are strictly related to the evaluation of studies on toxicity for the assessment of human health hazards or risks. Therefore, these criteria cannot be taken into account to evaluate the quality of the in vitro studies selected in this review. Other criteria can be selected as "fulfilled", "partially fulfilled", or "not fulfilled". The final score for each category can range between 0 and 100, where 100 is the situation for which all the criteria are judged "fulfilled". For all the studies, three criteria were removed from the reporting quality evaluation and four from the methodological quality evaluation because they were applicable only for the evaluation of the soluble tested component.

3. Results and Discussion

3.1. Search and Included Studies

From the initial search, 216 potential articles were found through database searching. After reading the titles and abstracts, 169 were excluded, and after reading the full-text articles, 33 articles were eliminated. A total of 14 articles were included for qualitative synthesis (Figure 3).

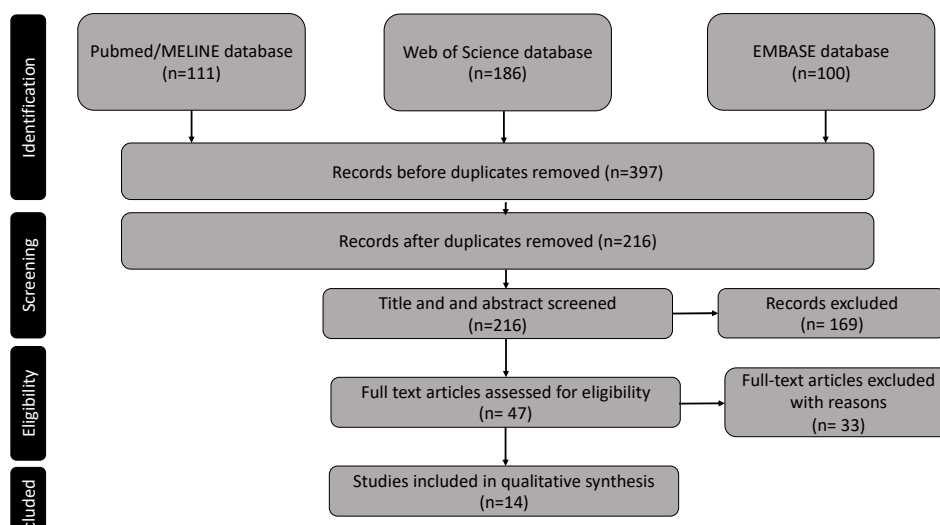


Figure 3. Flow chart depicting the selection process.

3.2. Quality Assessment of the Included Studies

According to previous systematic reviews of in vitro studies, the quality of the studies was evaluated by the SciRAP method (Figure 4).

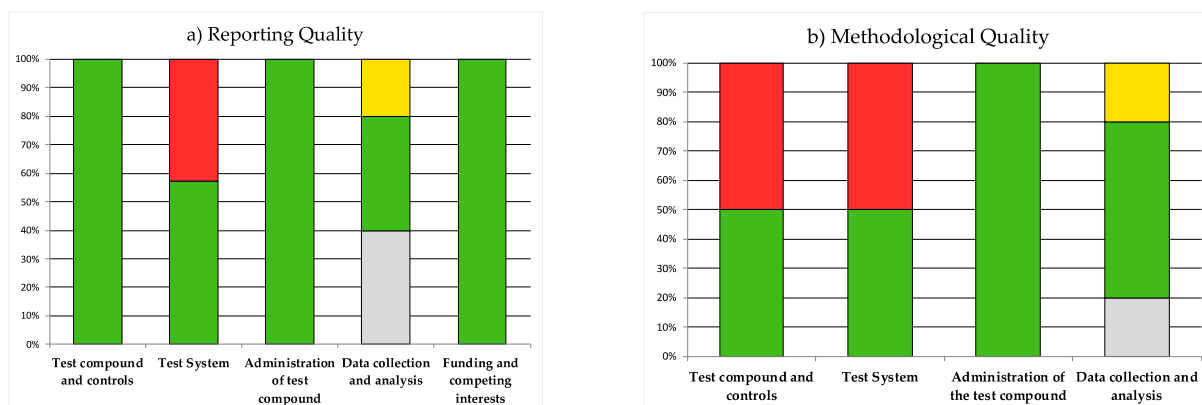


Figure 4. An example of a color profile generated with the SciRAP tool. In the color profile, the evaluation of (a) reporting quality and (b) methodological quality are illustrated in bar charts, showing green for fulfilled criteria, yellow for partially fulfilled criteria, and red for criteria that were not fulfilled.

All the included studies defined a machined or polished titanium surface as a control surface. All the included studies described the cell density for the evaluation of proliferation but not systematically for the analysis of other cell functions. A total of 11 out of 14 studies reported the manufacturer of the tested titanium materials. All the included studies clearly defined the tested cell lines (source), although not all specified the number of passages. Additionally, 8 studies described how they sterilized the samples before tests, and 11 detailed the number of replicates for each test. No calculation of the sample size was described, and only a few studies verified normality before performing the statistical test.

The mean reporting quality score was $87.7 \pm 7.7/100$ while the mean methodologic quality score was $77.8 \pm 7.8/100$. Details of quality evaluations are shown in Table 2.

Table 2. Reporting and methodological quality score of the studies included calculated with the SciRAP method.

		SciRAP Score		Ref.
		Reporting Quality	Methodologic Quality	
1	Wang et al., 2020	90	80	[8]
2	Gulati et al., 2020	95	80	[9]
3	Xu et al., 2020	80	70	[10]
4	Zheng et al., 2020	80	80	[11]
5	Llopis Grimalt et al., 2019	77.7	75	[12]
6	Wang et al., 2019	92.5	85	[13]
7	Ferrà-Cañellas et al., 2019	92.5	95	[14]
8	Nojiri et al., 2019	82.5	80	[15]
9	Gulati et al., 2018	72.5	65	[16]
10	Xu et al., 2018	97.5	80	[17]
11	Liu et al., 2014	87.5	70	[18]
12	Guida et al., 2013	95	85	[19]
13	Ma et al., 2012	92.5	70	[20]
14	Ma et al., 2011	92.5	75	[21]

3.3. Characteristics of the Included Studies

After full-text article reading, a meta-analysis was not possible given the extreme heterogeneity in these studies' designs and measurement parameters.

Table 3 summarizes the main characteristics of the reviewed studies. Pure titanium was the most common material used [8,9,13,14,16,18–21]. Some studies included grade 2 or 4 titanium [11,12,15,17], but none of them proposed a protocol including grade 5 titanium, which is generally the titanium alloy used for trans-gingival components.

Anodization parameters differed for each study. All the included studies systematically described the voltage, the anodization time, and the nature and composition of the electrolyte. One study highlighted the role of the distance between the cathode and the anode [14]. Two studies also described the importance of the age of the electrolyte [9,14] used specifically to conserve the underlying microroughness of a titanium substrate [22]. Little information was provided on the temperature of the bath, although the temperature can influence the viscosity of electrolytes. Platinum was the material most reported for cathodes, although one study used copper [15].

The choice of sterilization methods was described in 8 studies, whereas it can affect the biocompatibility of the TiO₂ surface. UV irradiation was chosen in 5 studies [9,10,16,20,21] and appears to be the most appropriate technique since it maintains the bioactivity of the nanostructure [23,24].

The voltages imposed were between 10 V [10] and 80 V [9,16]. The electrolytes were almost all composed of a viscous mixture (based on glycerol or ethylene glycol) and water. The presence of fluoride ion F⁻ was observed systematically, either as NH₄F or HF at a concentration of approximately 0.5% [8,10,11,13,17,20,21]. In contrast, some protocols included less F-content: 0.3% [9,16], 0.15% [19], or more 1% [18]. Four studies resulted in the formation of a surface with nanopores (NP) [9,12,14,16] and ten studies resulted in the formation of nanotubes (NT) [8,10,11,15,17–21,23]. Generally, the studies proposing a “short” anodization protocol with a time less than 30 min and the presence of a low amount of F⁻ resulted in NP features. On the other hand, with over 30 min of anodization and with a fluoride ion concentration of 0.5%, most of the studies showed the formation of well-defined, organized NT. One study showed that a rippled rough surface without NT or NP was obtained [15] under conditions with a lower voltage (1 V, 5 V, 10 V).

Table 3. Main characteristics of the studies reviewed.

Study/Year	Sample Preparation		Bioactivity Evaluation			
	Materials and Fabricant	Anodization: - Applied Voltage - Anodization Time - Electrolyte Composition	Cell Line (Type, Source, Number of Passages)	Sterilization before Testing	Analyzed Functions, Methodology, Cell Density (or Number of Cells) and Duration of Treatment	Number of Replicates
Wang et al., 2020	Pure titanium Cuibolin Nonferrous Metal Industry Co., Ltd., (Beijing, China).	• 50 V • 15 min • Ethylene glycol + 0.5 wt% NH₄F + 10 vol% DW	hGF from collections Passage: 2–6	NS	• Cell adhesion by the CCK – 8 assay (1×10^4 cells/well) at 1, 2, and 4 h • Cell proliferation by the CCK – 8 assay (5×10^4 wells/well) at 1,3,5 and 7 d • Cell morphology by SEM (1×10^4 cells/well) at 1, 4, and 24 h • Focal adhesion after VCL/DAPI staining and observation by confocal laser scanning microscopy (1×10^4 cells/well) at 4 and 24 h • Migration by a wound – healing assay (1×10^5 cells/well) at 12 and 24 h • Gene expression of adhesion-related proteins (FAK, ITGα2, ITGβ1, VCL, FN1) and ECM components (COL-1A1) by Rt-qPCR at 4 and 24 h • Type I collagen and fibronectin synthesis by ELISA at 1,4 and 7 d	n = 3 at least
Gulati et al., 2020	Pure titanium Nilaco, (Tokyo, Japan).	• 40 V; 60 V; 80 V. • 10 min • Ethylene glycol + 0.3 wt% NH₄F + 1% v/v DW	Primary hGFs Passage: 4	UV irradiation for 1 h each side	• Cell adhesion by calculations of morphology parameter at 1, 6 h, 1, and 3 d • Cell viability by Alamar Blue assay (1×10^4 cells/well) at 1,3 and 7 d • Cell morphology by SEM at 1 h to 7 d • Gene expression of adhesion-related proteins (FN, ITGβ1, ICAM-1), ECM components (COL-1, COL-3) and growth factor by Rt-qPCR (VEGF) at 1,3 and 7 d	n = 3
Xu et al., 2020	Titanium NS NS	• 10 V; 30 V; 60 V • 3 h • Glycerol (1,2,3-propanetriol) + 0.5 wt% NH₄F + 10 vol% DW	hGF from biopsies	UV irradiation for 30 min each side	• Cell adhesion after DAPI staining and analysis by fluorescence intensity (4×10^4 cells/well) at 2 h • Cell proliferation by the CCK – 8 assay (2×10^4 cells/well) 1,3,7 d • Cell morphology by SEM at day 2 (2×10^4 cells/well) at 2 d • Gene expression of adhesion-related proteins (FN, ITGβ1, VCL) and ECM components (COL-1) by Rt-qPCR (VEGF) at 1,3 and 7 d	n = 3
Zheng et al., 2020	Titanium grade IV Baoji Titanium Industry Co., Ltd. (Shaanxi, China)	• 30 V • 4 h • Glycerol (1,2,3-propanetriol) 50% + 0.27 M NH₄F + 50 vol% DW	hGF from collection	NS	• Cell adhesion after DAPI staining and analysis by fluorescence intensity (2×10^4 cells/well) at 4 h and 24 h • Cell proliferation by CCK-8 at 1, 3, 5, and 7 d • Migration by a wound-healing assay at 24 h • Gene expression of adhesion – related proteins (FN, FAK) by RT – qPCR (1×10^6 cells/well) at 24 h • Phosphorylated-FAK and fibronectin expression by western blot analysis at 24 h	NS

Table 3. Cont.

Study/Year	Sample Preparation		Bioactivity Evaluation			
	Materials and Fabricant	Anodization: - Applied Voltage - Anodization Time - Electrolyte Composition	Cell Line (Type, Source, Number of Passages)	Sterilization before Testing	Analyzed Functions, Methodology, Cell Density (or Number of Cells) and Duration of Treatment	Number of Replicates
Llopis-Grimalt et al., 2019	Titanium grade IV Implantmedia (Lloseta, Spain)	• 35 V; 60 V • 30 min and 10 min • Ethylene glycol + 0.1 M NH₄F + 8 M or 1 M DW	hGF from biopsies	NS	• Cell adhesion by Presto Blue reagent at 30 min • Cytotoxicity analysis by LDH activity at 48 h • Cell proliferation by Presto Blue reagent at 2,7 and 14 d • Collagen quantification after staining and absorbance at 14 d • Cell orientation after DAPI/FITC staining and observation by confocal laser scanning microscopy; duration: NS	NS
Nojiri et al., 2019	Titanium grade II Gallium Source (LLC, CA, USA).	• 30 V • 3 h • Ethylene glycol + 0.28 vol% NH₄F + 1.79 vol% DW	hGEC from collection	NS	• Cell adhesion by the CCK – 8 assay (1×10^5 cells/cm²) at 3 h • Cell adhesion by SEM at 3 h	n = 3
Wang et al., 2019	Pure titanium Northwest Institute for Nonferrous Metal Research (Xi'an, China)	• 20 V • 30 min • DW + 0.5% HF	hGEC from biopsies Passage: 2–5	NS	• Cell adhesion after DAPI staining and analysis by fluorescence intensity at 4 h (1×10^4 cells/well) • Cell morphology by SEM at 2, 6, 12 h and 3 d (1×10^4 cells/well) • Cell viability by CCK – 8 at 4 h, 1, 3, 5 and 7 d (1×10^4 cells/well) • Observation of the cellular uptake of pLAMA3 – CM by HEGCs by confocal laser scanning microscopy at 48 h (1×10^4 cells/well) • Gene expression of adhesion – related proteins at 48 h (LAMA3, ITGβ4) by RT – qPCR (1×10^6 cells/well) • Protein synthesis (LAMA3, ITGβ4) by fluorescence intensity at 3 d (1×10^4 cells/well)	n = 6
Ferra-Canellas et al., 2018	Pure titanium Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA).	• 35 V-1 V; 60 V • 30 min and 10 min. • Ethylene glycol + 0.1 M NH₄F + 1 M DW	hGF from biopsies Passage: 9 and 7	NS	• Cell adhesion by Presto Blue reagent at 30 min • Cytotoxicity analysis by LDH activity at 48 h • Cell proliferation by Presto Blue reagent at 7 and 14 d • Gene expression of proteins at 14 d (COL – 1, COL – 3, DCN) by RT – qPCR (1×10^6 cells/well) • Collagen quantification after staining and absorbance at 14 d	n = 6 or 3 depends on the test
Xu et al., 2018	Titanium grade II Western BaoDe (Xi'an, PR China)	• 20 V • 45 min • DW + 0.5% wt% HF	hGF from biopsies Passage:5 and 8hGEC from biopsies Passage: 2 et 4	Autoclave sterilized	• Cell adhesion by SEM at 24 h (1×10^4 cells/mL) • Cell morphology by SEM at 24 h (1×10^4 cells/mL) • Cell proliferation by CCK – 8 at 1, 3, 5, and 7 d (1×10^4 cells/mL) • Gene expression of adhesion – related proteins (ITGα6, ITGβ4, LAMA3, LAMB3, LAMG2 for hGEC and ITGα3, ITGβ1, FN and VCL for hGF) and ECM components by RT – qPCR at 7 d (5×10^4 cells/mL) • Type I collagen synthesis (for hGF) and hEGF protein secreted (for hGEC) synthesis by ELISA at 1,2 and 4 d (5×10^4 cells/mL)	n = 3

Table 3. Cont.

Study/Year	Sample Preparation		Bioactivity Evaluation			
	Materials and Fabricant	Anodization: - Applied Voltage - Anodization Time - Electrolyte Composition	Cell Line (Type, Source, Number of Passages)	Sterilization before Testing	Analyzed Functions, Methodology, Cell Density (or Number of Cells) and Duration of Treatment	Number of Replicates
Gulati et al., 2018	Pure titanium Nilaco, (Tokyo, Japan).	• 60 V, 80 V • 10 min, 15 min • Ethylene glycol + 0.3 wt% NH4F + 1% v/v DW	Primary hGF	UV irradiation for 1 h each side	• Cell proliferation by the CCK — 8 assay at 1, 4 and 7 d (5×10^4 cells/well) • Cell morphology by SEM at 24 h 1, 4 and 7 d (5×10^4 cells/well)	n = 3
Liu et al., 2014	Pure titanium NS	• From 0 to 25 V at 500 mV/s and kept at 25 V • 1 h • Glycerol (1,2,3-propanetriol) + 1.0 wt% NH4F + 15 vol% DW	hGF from collection Passage: 3–5	Ozone for 30 min	• Cell adhesion after DAPI staining and analysis by fluorescence intensity at 1 and 3 h • Cell proliferation by the MTS assay kit at 3, 4, 7, and 14 d • Cell morphology by SEM at 1, 3, 9 and 24 h (2×10^4 cells/cm²) • Gene expression of ECM protein (COL-1) by FQ-PCR at 3, 4, 7, and 14 d • Type I collagen synthesis by ELISA at 3, 4, 7, and 14 d	NS
Guida et al., 2013	Pure titanium P.H.I s.r.l (San Vittore Olana, Milano, Italy)	• 20 V • 24 h • DW + 0.15% HF + 1 M sulfuric acid	hGF from biopsies Passage: between 2 and 4	Autoclave sterilized	• Cell adhesion by MTT assay at 6 h (30.000 cells/cm²) • Cell proliferation by MTT assay at 48 h and 7 d (30.000 cells/cm²) • Cell morphology by SEM at 6 h and confocal laser scanning microscopy after staining at 24 h • Type I collagen synthesis by ELISA at 6, 48 h, and 7 d	All experiments were performed 2 times in triplicate on 2 different cell preparations
Ma et al., 2012	Pure titanium Northwest Institute for Nonferrous Metal Research (Xi'an, China)	• 20 V • 45 min • DW + 0.5% NH4F + 1 M ammonium sulfate	hGF from biopsies Passage: 4	UV irradiation for 2 h	• Cell adhesion by confocal laser scanning microscopy after DAPI staining at 30, 60, 120 min (1×10^5 cells/mL) • Cell proliferation by MTT assay at 1, 3, 6 and 9 d (4×10^4 cells/well) • Cell morphology by SEM at 3 d • Gene expression of ECM protein by RT-qPCR at 3, 6 and 9 d (VEGFA, ITGβ, ICAM1, LAMA1)	n = 3
Ma et al., 2011	Pure titanium NS	• 20 V • 45 min • DW + 0.5 vol% NH4F + 1 M ammonium sulfate	hGF from biopsies Passage: 4 L292 cells	UV irradiation for 2 h	• Cytotoxicity analysis by MTT at 24, 48, and 72 h • Cell adhesion by confocal laser scanning microscopy after DAPI staining at 30, 60, 120 min (1×10^5 cells/mL) • Cell proliferation by MTT assay at 3, 6 and 9 d (4×10^4 cells/well) • Gene expression of ECM protein by RT-qPCR at 3, 6 and 9 d (COL-1, COL-3, VEGFA, ITGβ, FN, ICAM1)	n = 3

Abbreviations: HF: hydrofluoric acid; NH4F: ammonium fluoride; DW: deionized water; Rt-qPCR: reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction; SEM: scanning electron microscope, CCK-8 assay: cell counting kit-8 assay; hGF: human gingival fibroblast; hGEC: human gingival epithelial cell, CCK-8: Cell Counting Kit-8 assay; MTS: methyl tetrazole sulfate; VCL: vinculin; COL-1: collagen 1; COL-3: collagen-3; ITG α 2: integrin α 2; ITG β 1: integrin β 1; ITG β 4: integrin β 4; FAK: focal adhesion kinase; FN: fibronectin; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC: phalloidin-fluorescein isothiocyanate; LAMA: laminin-5 α 3; DCN: Decorin; NS: Not Specified.

Biological experimentation to assess the behavior of in vitro cells differed from one study to another. The most frequently evaluated cell line was human gingival fibroblasts (hGFs) obtained from donors [9,10,12,16,17,19–21] or cell collections [8,11,15,18]. Three studies assessed the cell responses of epithelial cells (hGECs) [13,15,17]. Adhesion and proliferation were systematically assessed. Relative mRNA expression of adhesion-related genes or EMC components was also frequently investigated [8–10,13–15,17,18,20,21].

All the methodologies differed in terms of time points. For example, surface adhesion was evaluated in a range between 30 min [12,14,20,21] and 3 days [9]. Collagen production was assessed until day 7 [8], or until day 14 [18]. Controls also differed: rough titanium obtained after machining [19] or 3D printing [17] was used, as was polished titanium [18,20,21].

Table 4 summarizes the mechanical and biological results of the studies on the basis of the fabrication strategy employed. Three studies compared the fibroblast response on EA surfaces with unmodified Ti substrates [12,14,19]. Two articles included in their protocol a mechanical preparation of Ti surfaces before EA [9,16]. Nine studies evaluated hGFs behavior on EA surfaces followed by post-treatment. Regarding post-treatment, two studies out of nine proposed a simple post thermal treatment [8,10] whereas four performed a bioactive coating [11,13,15,17] and three studies proposed using NP and NT as a reservoir to deposit growth factors [18,20,21].

Table 4. Summary of the results of the studies reviewed on the basis of fabrication strategy. It was decided to keep the original names of the different groups in order to conform to the abbreviations chosen by the authors of the studies selected.

Study/ Year	Surface Characterization of EA Surfaces			Biological Evaluation	
	Surface Roughness of Tested Specimen and Control Surface	Morphology of the TNT/TNP (Diameter, Length, Tube Walls)	Water Contact Angle (WCA)	Evaluated Functions and Duration of Treatment	Results Compared to the Titanium Control Surface
Wang et al., 2020	Air-TNT: Ra = 45.8 ± 6.3 nm H2-TNTs: Ra = 51.4 ± 2.3 nm Control: Ra = 8.9 ± 2.4 nm	TNT Diameter: 100 nm Length: 1 μ m	Air-TNT: $36.6 \pm 2.0^\circ$ H2-TNTs: $3.5 \pm 0.8^\circ$ Control: $95.1 \pm 1.5^\circ$	Electrochemical anodization + heat treatment	
				Cell adhesion at 1, 2, and 4 h	Proliferation was higher on Air-TNT and H2-TNT surfaces at 7 d.
				Cell proliferation at 1, 3, 5, and 7 d	Cell adhesion on H2-TNT was higher than that of other groups.
				Cell morphology at 1, 4, and 24 h	More filopodia at 1 h and more elongated morphology at 4 h.
				Evaluation of focal adhesion at 4 and 24 h	Presence of mature elongated FA formed at the periphery of the cells on TNT surfaces.
				Migration at 12 and 24 h	Cells gradually filled the wound within 24 h.
				Gene expression at 4 and 24 h	At 4 and 24 h, HGFs on H2-TNTs showed higher mRNA expression levels of focal adhesion kinase and integrin- β 1.
				Collagen production at 1, 4, and 7 d	At 1 h, 4, and 7 d, the collagen secretion from the HGFs on the H2-TNTs was higher than that on the air-TNTs and Ti control.
Xu et al., 2020	NS (Diagram without associated values) NT surface: 500 nm < Sa < 1 μ m Control Ti surface: Sa $\approx$ 1.5 μ m	TNT NT10: Diameter: 30 nm NT30: 100 nm NT60: 200 nm	NS (Diagram without associated values) WCA for NT surface < 40° . Hydrophilicity increased with the diameter. WCA for Ti Control surface $\approx$ 50°	Cell adhesion after 2 h	Cell adhesion was improved on NT10 and NT30 after 2 h but severely inhibited on NT60.
				Cell proliferation at 1, 3 and 7 d	NT10 and NT30 promoted cell proliferation, but NT60 decreased it.
				Cell morphology at 2 d	Cells on T10 and NT30 elongated further, and a large number of prominent filopodia and lamellipodia extensions was observed.
				Gene expression at 7 d	The expression of VCL and FN genes became increasingly higher for NT30 at NT10 at 7 d.

Table 4. Cont.

Surface Characterization of EA Surfaces				Biological Evaluation	
Study/ Year	Surface Roughness of Tested Specimen and Control Surface	Morphology of the TNT/TNP (Diameter, Length, Tube Walls)	Water Contact Angle (WCA)	Evaluated Functions and Duration of Treatment	Results Compared to the Titanium Control Surface
Mechanically prepared + Electrochemical anodization					
Gulati et al., 2020	TNP-60: Ra = 134.43 ± 33.8 nm Micro-Ti: Ra = 40.80 ± 3.2 nm Rought-Ti (Control): Ra = 74.57 ± 2.7 nm	TNP TNP-40: Diameter: 50 nm TNP-60V: Diameter: 60 nm TNP-80V: Diameter: 75 nm	NTP-40: 46.08 ± 0.68° NTP-60: 59.08 ± 1.36° NTP-80: 38.05 ± 0.64° Micro-Ti: 47.98 ± 2.02° Rought-Ti: 44.70 ± 0.28°	Cell adhesion at 1 h, 6 h, 1, and 3 d	After 6 h of seeding, cell length and cellular area were higher for TNP-40 and TNP-60 as compared to Rough and Micro-Ti.
				Cell viability at 1, 3, and 7 d	By day 7, Micro-Ti and NP surfaces enhanced cell proliferation.
				Cell morphology 1 h to 7 d	Even at 1 h, there were more filopodia on the NP surfaces. Fibroblasts formed close contact with the NP at all points.hGFs spread and elongate parallel to TNPs at 1 d.
				Gene expression at 1,3 and 7 d	Enhanced collagen I/III and integrin-β1 mRNA expression at day 3–7.
Gulati et al., 2018	TNS-50: Ra = 134.43 ± 33.8 nm TNS-70: Ra = 91.24 ± 7.1 nm Miro-Ti: Ra = 40.80 ± 3 nm	TNP TNS-50: Diameter: 50 nm Length: 8 μm TNS-70: Diameter: 70 nm Length: 12 μm	NS	Cell morphology at 1,6 h, 1, and 4 d	hGFs were elongated and confluent on the TNS surfaces and found to be aligned in the direction of the NP.
				Cell proliferation at 1, 4, and 7 d	No difference.
Electrochemical anodization only					
Llopis- Grimalt MA et al., 2019	NP: Ra = 31.3 ±1.9 nm Sku = 3.74 ± 0.39 nm Ssk = 0.2 ± 0.07 nm NN: Ra = 55.8 ±1.6 nm Sku = 2.81 ± 0.13 nm Ssk = 0.07 ± 0.04 nm Ti-Control: Ra = 28.9 ± 0.7 nm Sku = 6.78 ± 2.96 nm Ssk = 0.34 ± 0.24 nm	TNP NP: Diameter: 52.9 ± 0.9 Length: NS NN: Diameter: 77.7 ± 0.7 nm Length: 47.4 ± 0.5 nm	NP: 17.7 ± 1.3° NN: 84.3 ± 3.8° Control: 71.7 ± 8.7°	Cell adhesion after 30 min	Both surfaces (NN and Control) showed similar results for cell adhesion.
				Cytotoxicity analysis at 48 h	No difference of hGFs cultured with conditioned media.
				Cell proliferation at 2, 7, and 14 d	Metabolic activity of hGFs was higher in culture on NN surfaces.
				Collagen quantification at 14 d	Collagen deposition of hGFs was higher on NN surfaces.
Ferra- Canellas et al., 2018	NP-S: Ra = 54.7 ± 1.4 nm Surface area = 26.4 ± 0.5 μm ² Rsa = 5.41 ± 0.21% NP-B: Ra = 41.6 ± 5.5 nm Surface area = 30.4 ± 0.4 μm ² Rsa = 21.6 ± 1.6%Ti-control: Ra = 51.7 ± 5.71 nmSurface area = 26.4 ± 0.2 μm ² Rsa = 5.68 ± 0.86%	TNP NP-S: Diameter: 48.2 ± 1.2 nm NP-B: Diameter: 74.0 ± 3.3 nm	NP-S: 79.6 ± 2.2° NP-B: 65.5 ± 5.8° Ti-control: 53.2 ± 2.5°	Cell orientation	hGFs cultured on NN surfaces exhibited a high frequency of alignment.
				Cell adhesion at 30 min	Cell adhesion was increased by the NP-B surface compared to other surfaces.
				Cytotoxicity analysis at 48 h	All surfaces gave cytotoxicity values under the 30% limit established.
				Cell proliferation at 7 and 14 d	Difference between donors.
Guida et al., 2013	Oxidized: Sa = 0.076 μm (0.061–0.097) Sdr = 10.5% (7.39–24.2) Turned (Control): Sa = 0.036 μm (0.02–0.69) Sdr = 0.799% (0.212–2.48)	“Nano-tubules” External diameter: 119 ± 22 nm Internal diameter: 50 ± 11 nm	NS	Gene expression at 14 d	Difference between donors.
				Collagen quantification at 14 d	Higher collagen deposition cultured onto NP-B for both donors with statistical difference only for donor B.
				Cell adhesion at 6 h	Higher numbers of adhesive cells were evidenced on oxidized surfaces.
				Cell proliferation at 48 h and 7 d	The proliferation rate was higher on oxidized surfaces. The maximum difference was reached at 7 d.
Guida et al., 2013	Oxidized: Sa = 0.076 μm (0.061–0.097) Sdr = 10.5% (7.39–24.2) Turned (Control): Sa = 0.036 μm (0.02–0.69) Sdr = 0.799% (0.212–2.48)	“Nano-tubules” External diameter: 119 ± 22 nm Internal diameter: 50 ± 11 nm	NS	Cell morphology at 6 h	Many cellular processes were visible on oxidized surfaces. At higher magnification, intimate interactions between filopodia and the nano-tubular structures were observed. More evident spreading could be observed on the oxidized surfaces.
				Collagen synthesis 6 h, 48 h, 7 d	hGFs plated on oxidized surfaces showed to synthesize a higher amount of protein at 7 d.

Table 4. Cont.

Surface Characterization of EA Surfaces				Biological Evaluation	
Study/ Year	Surface Roughness of Tested Specimen and Control Surface	Morphology of the TNT/TNP (Diameter, Length, Tube Walls)	Water Contact Angle (WCA)	Evaluated Functions and Duration of Treatment	Results Compared to the Titanium Control Surface
Electrochemical anodization + Deposition/coating and biopolymer conjugation					
Zheng et al., 2020	NS	TNT Diameter: 100–170 nm Length: 1.2 µm	NS (Diagram without associated values)	Cell adhesion at 4 h and 24 h	At both times, Ti-O2-NT with Au decorations exhibited better affinity towards hGFs compared with NT or control surfaces.
				Cell proliferation at 1, 3, 5, and 7 d	Higher proliferation on NT-Au surfaces compared with NT or control surface at all time points.
				Migration at 24 h	Improvement in wound contraction observed on NT-Au surfaces compared to control group.
				Gene expression at 24 h	AU-NT surfaces upregulated the gene expression level of FN and FAK.
				Phosphorylated-FAK and fibronectin expression at 24	Au-NT surfaces enhanced the protein expression of FN and pFAK.
Wang et al., 2019	NT-Ti: Sa = 22.1 ± 0.23 nm Chi/Col-Ti: Sa = 17.7 ± 0.12 nm Chi/Col/pLAMA3-CM- Ti Sa: Sa = 15.4 ± 0.17 nm S-Ti (Control): NS	TNT Diameter: 100 nm	S-Ti: 46.62 ± 4.66° NT-Ti: 12.86 ± 1.63° Chi/Col-Ti: 30.48 ± 1.84° Chi/Col/pLAMA3-CM- Ti: 29.12 ± 4.04°	Cell adhesion at 4 h	Adhesion was better on S-Ti than on NT-Ti Coated surfaces allowed better adhesion than S-Ti or NT-Ti.
				Cell morphology at 2, 6, 12 h, and 3 days	On NT surfaces and coated surfaces, hGECs were spherical, and filopodia extensions were observed after 2 and 6 h. On coated surfaces, at 12 h, cells were well-flattened with filopodia and lamellipodia.
				Cell viability 4 h, 1, 3, 5, and 7 d	No difference was found among the groups.
				Gene expression at 48 h	The LAMA3 and ITGβ4 expression levels were decreased in cells cultured on NT-Ti compared with those cultured on the control ones. Biological coating further increased the expression levels of both genes.
				Protein synthesis at 3 d	hGECs on the coated specimen presented relatively higher protein expression levels of proteins (LAMA3, ITGβ4).
Nojiri et al., 2019	NS	TNT Diameter: 67 nm	NS	Cell adhesion at 4 h	On NT surfaces without collagen, limited numbers of hGEC were seen compared with Col-NT surfaces. hGEC exhibited round-up morphology of weak adhesion.
Xu et al., 2018	AO (NT surface): Ra = 2.15 ± 0.04 µm AOC (NT + CaP): Ra = 2.15 ± 0.06 µm SLM (As built Ti): Ra = 7.57 ± 0.32 µm MP (Mechanically polished): Ra = 0.39 ± 0.01 µm	TNT Diameter: 70–90 nm Length: 200–250 nm	AO (NT surface): 40.7° AOC (NT + CaP): 18.3° SLM (rough Ti): 73.9° MP: 76.3°	Cell adhesion and cell morphology at 24 h	Protusions extending from the lamellipodia were visible on hGEC and wrapping around the NT. hGFs were more stretched and presented more extended lamellipodia.
				Cell proliferation by at 1,3,5, and 7 d	hGECs: AOC and MP surfaces > AO and SLM surfaces at 1,3,5, and 7 d. hGFs: AOC > AO > MP > SLM at 1,3,5, and 7 d.
				Gene expression at 7 d	hGEC: (AOC = MP) > (AO = SLM) at 7 d. hGFs: expression levels of FN and VCL followed the order of AOC > AO > SLM > MP. For ITGα3 and ITGβ1: AOC > AO > MP > SLM.

Table 4. Cont.

Surface Characterization of EA Surfaces				Biological Evaluation	
Study/ Year	Surface Roughness of Tested Specimen and Control Surface	Morphology of the TNT/TNP (Diameter, Length, Tube Walls)	Water Contact Angle (WCA)	Evaluated Functions and Duration of Treatment	Results Compared to the Titanium Control Surface
Liu et al., 2014	NS (Diagram without associated values) NT: Ra ≈ 200 nm NTB (Bovine serum albumin loading): Ra > 200 nm PT (Control): Ra < 200 nm	TNT Diameter: 80–100 nm Tube walls thick: 15–20 nm	NS (Diagram without associated values) PT > NT > NTB	hEGF protein secreted (for hGEC) and type I collagen synthesis (for hGF) at 1,2 and 4 d	hGEC: SLM and AO groups had lower expression than the MP and AOC groups after 7 d. hGFs: AOC > AO > MP > SLM at 7 d.
				EA + Therapeutic delivery (loading)	
				Cell adhesion 1 and 3 h	At 1 h and 3 h: NTB > NT > PT.
				Cell proliferation at 3, 4, 7, and 14 d	No difference before 14 d. The proliferation activity of the hGFs increased over time on all surfaces.
				Cell morphology at 1, 3, 9, and 24 h	3 h after seeding, hGFs displayed ellipsoid spherical shapes with many pseudopodia anchoring to the TNT surfaces. At 9 h, they extended further. On the NTB surfaces, hGFs revealed many protruding pseudopodia at 1 h.
				Gene expression at 3, 4, 7, and 14 d	Gene expression on NT surfaces > PT surfaces after 4, 7, and 14 d. Gene expression on NTB surfaces > on PT surfaces after 7 and 14 d. Gene expression on NTB surfaces < NT surfaces after 3, 4, 7 d.
				Collagen synthesis at 3, 4, 7, and 14 d	COL-1 concentrations on PT surfaces > NT surfaces at 3 and 4 d. NT surfaces > PT at 7 d. The COL-1 concentration was the lowest on the NTB surfaces after 3, 4, and 14 d.
Ma et al., 2012	NT: Ra = 4.96 ± 0.5 nm NT-F-L/M/H (FGF2-immobilized at different concentrations): Ra = from 7.25 ± 0.97 nm to 9.42 ± 1.99 nm PT: Ra = 32.6 ± 3.45 nm	TNT Diameter: ≈100 nm Length: 588.8 ± 31.92 nm	NS	Cell adhesion at 30, 60, and 120 min	The number of adhering cells on NT-F-L and M was higher than those on the PT, NT, or NT-F-H at all times points. NT-F-M showed the highest cell adhesion Cell adhesion on NT surfaces was decreased compared with PT.
				Cell proliferation at 1, 3, 6, and 9 d	NT surfaces enhanced proliferation at 3 d compared with NT surfaces. NT-F-L and NT-F-M enhanced proliferation compared with PT surfaces at all time points.
				Cell morphology at 3 d	Observed differences were slight.
				Gene expression at 3, 6, and 9 d	NT-F-L and NT-F-M showed beneficial ECM-related gene expression.
Ma et al., 2011	NT: Ra = 27.76 nm RZ = 260.5 nm NT-Ag (Silver-loaded): Ra = 29.10 nm RZ = 128.1 nm NT-Ag-F (Siler/FGF2 immobilized): Ra = 34.18 nm RZ = 156.2 nm PT: Ra = 58.1 nm RZ = 128.5 nm	TNT Diameter: ≈ 100–120 nm	NS (Diagram without associated values) (PT and NT-Ag-F) > (NT and NT-Ag)	Cytotoxicity analysis at 24, 48, and 72 h	No difference in cellular response.
				Cell adhesion at 30, 60, 120 min	Cell adhesion was higher on NT-Ag-F surfaces than those on PT, NT, and NT-Ag at all time intervals. NT surfaces seemed to inhibit cell adhesion.
				Cell proliferation	Cell proliferation was better on NT-Ag-F surfaces than on PT, NT, and NT-Ag at all time intervals.
				Gene expression	HGFs cultured on NT-Ag-F surfaces showed advantageous gene expression.

Abbreviations: TNT: titania nanotubes; TNP: titania nanopores; EA: electrochemically anodized; MP: Mechanically polished; FA: focal adhesion; Ra: average roughness; Ssk: surface skewness; Sku: surface kurtosis; AO: anodic oxidation; SLM: selective laser melting.

3.4. Nano Surface Characteristics of Anodized Titanium

3.4.1. Morphological Characteristics and Surface Roughness

The fabrication of nanoporous structures like nanopores (NP) or nanotubes (NP) by EA modifies surface topography. In the included studies, Ra, which is the arithmetical mean deviation of the profile assessed, is the most widely used one-dimensional roughness parameter. After electrochemical anodization, the reported Ra varied on average from 4.96 nm [20] to 2 μm [17]. This variation was due to the initial surface condition of the selected Ti surfaces, which varied for each study. Some surfaces were polished mechanically, while others were left in a rough state, either after machining or 3D printing. The highest surface roughness was found for a titanium material obtained by an additive process that initially increased the surface roughness [17] due to powder particle agglomeration. The lowest roughness was described for a titanium material polished mechanically before EA [20]. Most of the studies reported that anodized Ti surfaces obtained from a polished or machined titanium surface exhibited Ra values measured by AFM in the range of 40 to 80 nm. The average values reported by the studies were 45.8 nm [8], 40.8 nm [9], 55.8 nm [12], 54.7–41.6 nm [14], and 76 nm [19]. Such reported values were lower than 0.2 μm which can be considered a threshold below which no further significant changes in bacterial adhesion might be observed [25].

Since Ra does not distinguish between hollows and protrusions, this parameter might be insufficient for the description of the nanoarchitecture of surfaces, and misinterpretations about the roughness can be made. For instance, a study showed that the Ra was 2 times lower for anodized surfaces than for polished surfaces (27.76 nm vs. 58.17 nm) while Rz (which is the average value of the absolute values of the heights of the 5 highest-profile peaks and the depths of the 5 deepest alleys within the evaluation length) was 2 times higher for anodized surfaces (260.5 nm vs. 128.5 nm) [21]. The surfaces of the anodized surfaces may appear smoother than before anodizing, but it should be recalled that the pores or tubes generate a depression whose depth affects roughness. Thus, some studies proposed to analyze the surface topography through additional parameters. Guida et al., 2013 [19] did not consider Ra but Sa, which is the extension of the Ra parameter to a surface. Furthermore, they correlated the Sa measurement to the interfacial area ratio developed (Sdr). Sdr is expressed as the percentage of additional surface area due to the texture as compared to an ideal projected plane for which Sdr = 0. They reported that anodized surfaces show a surface area 10% larger than the projected surface compared to 1% on the polished surface. Similarly, Ferra-Canellas et al., 2018 [14] indicated that the surface area difference (Rsa), defined as the percentage increase of the 3D surface area over the projected 2-dimensional surface area, was 4 times higher for NP-B anodized surfaces than for control surfaces despite smaller Ra values for anodized samples.

From the 3-dimensional viewpoint, anodized surfaces offer quantitatively more reactive sites than “flat” surfaces. This “additional” surface is indeed provided by the internal walls of the NT or NP. This particularity would enhance the adhesion of the cells since it emphasizes the possibility of anchoring sites. From the 2-dimensional viewpoint, the presence of NT quantitatively decreases the surface area due to the hollow structure.

It should be noted that the values found in these studies are dependent on the experimental limitations inherent to the technology used and the surface geometry. For instance, the pyramidal shape of the AFM tip probably prevents it from entering into the bottom of the NT/NP.

The nanotopography is dependent on the morphology of NT/NP, whether it is the diameter (pore size), length (or depth), thickness of the walls, or inter-gap distance in the case of NT, or the inter-pore distance in the case of NP.

In the included studies, the internal diameters varied from 30 nm to 200 nm [10]. These values generally correspond to a measurement made along the longest axis of the pores, since NPs and/or NTs never exhibit perfect circularity. Studies with a high voltage anodizing process show larger pore sizes [9,10,15,16]. This is in line with literature data showing that the diameter of the TiO_2 NT/NP increases linearly when increasing

anodizing voltage. Regarding NT diameter, most studies report values between 90 and 120 nm, whether for a potential of 50 V for 15 min [8], 30 V for 3 h [10], 20 V for 30 min [13], 20 V for 45 min [17], 25 V for 1 h [18], 20 V for 24 h [19], and 20 V for 45 min [20,21].

Other morphological characteristics such as length or wall thickness were not systematically reported in these studies. Interestingly, Wang et al., 2020 [8] analyzed the longest NTs with a length of about 1000 nm for a high voltage (50 V) associated with a short time (15 min) in a viscous electrolyte. Xu et al., 2018 [17] reported lengths ranging from 200–250 nm, and Ma et al., 2012 [20] described NTs with lengths of 588.8 ± 31.92 nm. These “shorter” NTs were found mainly for purely aqueous electrolytes, which was also in agreement with previous reports [4]. Only one study reported a value for wall thickness equal to 15–20 nm [18]. In another study, by calculating the difference between the reported external diameter and the internal diameter, the deduced wall thickness of the “nano-tubules” was about 70 nm [19]. This wall thickness is a very important criterion since it provides an anchor point for the cytoplasmic extensions of the gingival cells in the case of NT. Furthermore, the wall thickness also influences the chemical nature of the reactive sites. In the case of NP, it is the distance between the pores that is important [9].

The different post-functionalizations of anodized surfaces also change the roughness. Ma et al., 2011 [21] showed that surfaces functionalized with silver nanoparticles and FGF (fibroblast growth factors) have a higher surface roughness than simply anodized surfaces (34.18 nm vs. 27.76 nm). Similarly, Liu et al., 2018 [18] showed that the surface roughness on bovine serum albumin-functionalized surfaces has higher Ra values (up to 700 nm) than anodized surfaces (200 nm). On the other hand, the surfaces modified by a coating based on chitosan and collagen tended to smooth the surface since they showed a lower Sa value (17.7 nm) than the simply anodized surfaces (22.1 nm) [13]. These remarks suggest that the post-functionalization grafted entities do not adsorb on the same adhesion sites of the nano-structured surface. For example, when the Sa is lower, it would imply that the biomolecules such as biopolymer could be located in the “hollows” of the surface, thus reducing the roughness.

To summarize, anodizing modifies the roughness at the nanometric scale. This nanometric modification does not affect the roughness at the micron scale, which is dependent on the initial surface condition of the material.

3.4.2. Morphological Characteristics and Surface Roughness

• Wettability

Electrochemical anodization improves wettability in the case of NT formation. Water contact angle (WCA) is systematically decreased for anodized surfaces with the presence of NT compared to a non-anodized control surface [8,10,11,13,17,18,21]. It seems that the morphological characteristics of the NT and, more specifically, the diameter, influence wettability: the larger the diameter, the smaller the contact angle [10]. NP features lead to a less hydrophilic surface than NT [9,12] even if a pore size above 70 nm may allow a better WCA than a pore size of 50 nm [9,14].

All the included studies show that WCA on anodized surfaces was less than 90°, which implies that all the anodized surfaces, no matter NP or NT morphology, can be considered as hydrophilic. This hydrophilic behavior associated with a nanostructure surface could induce the deposition of adhesion-related proteins from physiological fluids in the NT/NP.

Wettability is directly related to surface energy. Ma et al., 2011 [21] showed that the higher the contact angle, the lower the surface energy calculated by the Owens equation [21]. Surface energy modulates the ability of the surface to establish electrostatic, Van der Waals, or hydrogen bonds with a polar medium, like water, and then plays a big role in the initial adsorption of protein and cell adhesion.

Functionalization also changes wettability. Wang et al., 2020 reported that surfaces anodized and then modified with a coating of collagen and chitosan have a significantly higher contact angle than simply anodized surfaces [13]. Conversely, surfaces anodized

then coated with calcium phosphate nanoparticles [17], surfaces anodized and then loaded with bovine serum albumin (BSA) [18], and surfaces decorated with gold nanoparticles [11] are more hydrophilic than anodized surfaces alone.

- Crystalline phase

The crystalline or amorphous nature of TiO_2 is also one of the parameters affected by the anodization treatment, and especially by the possible post-anodization heat treatments. Two studies assessed the absence of crystallinity of the oxide layer in the case of NT formation [8,10]: after anodization, TiO_2 NTs are generally in amorphous form. The authors performed post thermal treatments to modify the crystallinity of the oxide layer of the anodized parts. After annealing in air at 450 °C for 2 h, the XRD (X-ray diffraction) patterns showed Ti and anatase peaks without any rutile or amorphous peaks [10]. Similarly, after annealing in air at 550 °C for 2 h, or at 500 °C for 4 h in air with a controlled hydrogen atmosphere, the XRD pattern showed that the amorphous titanium changed to an anatase phase [8]. This annealing resulted in an increase of the compact layer at the metal/NT interface, which led to a decrease in NT length. Above a certain temperature, the tubular structure is lost. The conversion from amorphous to anatase phase can have consequences on mechanical, chemical, electronic, optical, and biomedical properties since the anatase crystal type possesses good anti-bacterial properties. Although none of the included studies mentioned this point, it should be noted that raising the annealing temperature to 580 °C may remove surface hydroxyl groups and even cause the NP/NT structure to collapse [26], thus reducing the other properties (i.e., hydrophobicity) [27].

3.5. Biological Results of the Studies Reviewed

3.5.1. Biological Behavior of Human Gingival Fibroblasts (hGFs) Regarding Anodized Surfaces

- Cell adhesion

The majority of the studies presented in this review showed that a titanium surface modified by anodization allows, in vitro, better adhesion of hGFs on the surface compared to conventionally polished or machined titanium.

Based on measures performed on SEM images, Gulati et al., 2020 [9] showed that hGFs seeded on nanoporous surfaces superimposed on micro-scale features exhibited a more elongated and spread-out shape at 6 h than hGFs seeded on control surfaces (rough or polished). After DAPI staining and analysis by fluorescence intensity at 1 and 3 h, Liu et al., 2014 [18] showed that cell adhesion at 1 and 3 h was better on NT surfaces (with an Ra equal to 200 nm, a diameter of 100 nm, and a wall thickness of 15–20 nm) than on polished surfaces. Using colorimetric tests, Ferra-Canellas et al., 2018 [14] reported that at 30 min, hGFs statistically adhered better on nanoporous anodized surfaces (with a pore size equal to 74.0 ± 3.3 nm and an Rsa 4 times higher than the control surface). Similarly, Guida et al., 2013 [19] proved that at 6 h, adhesion is statistically increased when hGFs are in contact with nano-tubular anodized surfaces (with a diameter of 120 nm and thick walls of 70 nm) compared to the titanium control surface.

In contrast, other studies did not report favorable results. Llopis-Grimalt et al., 2019 [12] concluded that at 30 min, there are no differences regarding HGFs adhesion between control and nanoporous anodized (NN) surfaces. These NN surfaces with a pore size equal to 77.7 ± 0.7 nm present a lower wettability than the control surface. Ma et al., 2012 [20] reported that NT surfaces with a diameter of 100 nm and without functionalization significantly decreased cell adhesion at 30 min, 1 h, and 2 h. The authors explained that nano-tubular anodized surfaces present “hollows” that quantitatively decrease the contact area available for cell adhesion. This study did not report the value of wall thickness, but it was possible through SEM images to provide a rough estimation of about 10 nm. However, it has been described that filopodia (which are thin cytoplasmic extensions in the region of tens of nanometers) can detect surface topographic features of about 15 nm [28], as presented in Liu et al., 2014 [18]. The main difference between Liu et al., 2014 and Ma et al., 2014 resided in the composition of the electrolyte. In one study [20], the aqueous

electrolyte led to the formation of NT arrays with thin wall thicknesses, while in the other, the viscous glycerol-based electrolyte with only 15% water content [18] led to an NT with greater wall thickness, which is consistent with a previous study [29]. Although ultrathin walls are essential for some applications (such as photocleavage of water), favoring a wall with at least 15–20 nm thickness would be interesting for biomedical applications.

These quantitative findings regarding adhesion are consistent with qualitative analysis since all the studies investigating hGFs morphology through SEM images or by immunofluorescence agreed that hGFs in contact with an EA surface present a morphology favorable to adhesion in contrast to similar cells cultured on control Ti surfaces. All the authors observed the presence of more lamellipodia and filopodia than on a polished or machined control surface [9,16–20].

At a higher magnification on NT surfaces, filopodia anchor on the edges of the tubes (and not inside the tube), which occurs at a very early point [8,10]. On NP surfaces, the authors described an intimately close correlation of fibroblast projections with the nanopores [9]. Figure 5 shows the morphology of hGFs spreading on TiO₂ NP at day 1 of the culture.

Furthermore, when nanopores are aligned with micro-machining lines fabricating EA, hGFs stretch along the direction of nanopores. This better alignment of the cells is interesting because the secreted proteins, like collagen, could be deposited and oriented in the same direction and not randomly [30].

In addition, some of the studies found in this work also highlight the possibility that anodized surfaces promote not only better adhesion, but also faster attachment of gingival fibroblasts [9,18]. This kinetic aspect is crucial as it is known that during the insertion of a biomaterial, there is “a race to the surface” between epithelial cells, fibroblastic cells, and bacterial cells [31,32]. If local human cells colonize the surface promptly and create a close loop of connective tissue around the oral implant, it may prevent bacterial invasion.

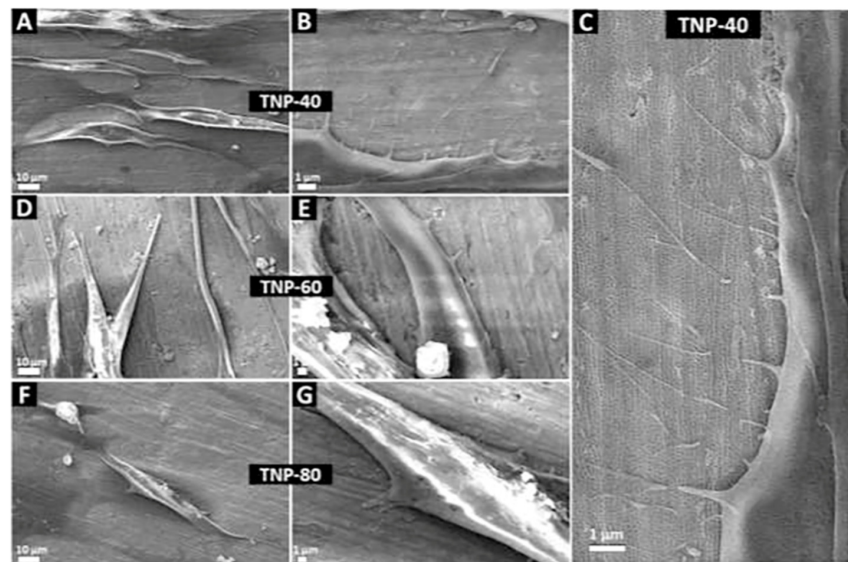


Figure 5. hGFs on TiO₂ surface with NP after 1 day, (A–C) TNP-40, (D,E) TNP-60, (F,G) TNP-80. Adapted with the permission from [5180781375259] [9].

This adhesion is dependent on the adsorption of proteins. Since the size of plasma proteins such as fibronectin is nanometric, the adsorption kinetics of these proteins, as well as the quantity adsorbed, are influenced by surface properties at a very small scale. These surface properties are based on the nature (chemistry and structure) of the reactive sites located on the surface and especially on the tube edges in the case of NT. These characteristics are closely related to several physical parameters such as roughness, surface

energy, surface charge (isoelectric point), and wettability. Since anodizing changes all these surface properties, this process has a significant influence on adsorption. Overall, it appears that anodized surfaces provide better protein adsorption. However, this assertion is true up to a certain limit. Indeed, beyond a diameter of about 70–100 nm [10], proteins are no longer adsorbed on the surface of the NT but probably tend to migrate to the bottom of the wells inaccessible to cells [8]. Furthermore, protein adhesion to the surface of the trans-gingival component depends on the spatial distribution of surface charges relative to the distribution of plasma protein charges. To avoid protein unfolding leading to denaturation, a certain level of hydrophilicity should not be exceeded. An excessive surface energy of anodized surfaces could explain why cells adhere less well on anodized surfaces than on control surfaces [21].

Depending on the pressures and mechanical stimuli that the cells perceive through their adhesion to the substrate and also through the intercellular contacts that are formed, a series of intracellular biochemical reactions will be triggered. These reactions will influence cell proliferation, the secretion of ECM components, and even promote cell migration, thus influencing wound healing.

- Cell proliferation

Most of the studies analyzed report that, compared to conventionally used smooth surfaces (polished or machined), EA surfaces ensure better fibroblast proliferation. Proliferation is analyzed through metabolic activity by several tests based on the incubation of colorimetric markers at different times. For Guida et al., 2013 [19], the metabolic activity of hGFs in contact with nano-tubular EA surfaces was slightly better at day 2 and then much higher at day 7, whereas for Gulati et al., 2020 [9], the metabolic activity of hGFs in contact with EA surfaces was increased compared to control raw surfaces only at day 7. In addition, there were no significant differences between the 40 V, 60 V, and 80 V anodized surfaces with nanopore diameters of 50 nm, 60 nm, and 75 nm, respectively. Llopis-Grimalt et al., 2019 [12] also tended to find an improvement in metabolic activity at day 14, i.e., at the end of the experiment. They did not find any difference at day 2 or day 7 between hGFs seeded in contact with polished surfaces or in contact with nanoporous surfaces with a diameter of about 80 nm. Liu et al., 2014 [18] followed this trend as enhanced hGFs metabolic activity on surfaces with an NT diameter of 80–100 nm compared to polished surfaces was detectable only at day 14. These observations are consistent with the “normal” in vivo biological processes that take place after any injury. Within the first 2 days, processes related to inflammation appear, then after this 48 h period, new tissue formation occurs, characterized by cell proliferation. Finally, after 10 to 15 days, tissue remodeling processes are in place.

Conversely, Ma et al., 2012 [20] and Ma et al., 2011 [21] showed a slight increase in metabolic activity at day 3 that was not found at day 6 or day 9. This was in line with the results they described regarding adhesion and correlated with NT morphology in the previous paragraph. On the other hand, Xu et al., 2018 highlighted better metabolic activity for hGFs on anodized surfaces compared to those grown on polished surfaces at all time points (1st, 3rd, 5th, and 7th day). The difference with previous studies resided in the fact that Xu et al., 2018 anodized titanium surfaces obtained by the SLM additive manufacturing technique. The anodized surfaces exhibited not only nano roughness due to the presence of NT but also microroughness inherent to the manufacturing process, possibly explaining the better cell proliferation in vitro at the first time point.

- Influence on the expression of soft tissue integration genes and production of specific proteins by hGFs

The majority of studies included in their protocol analysis by RT-qPCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) of the expression of genes coding either for proteins found in cell adhesion mechanisms (such as fibronectin, vinculin, laminins, or integrins) or for the production of structural proteins of the extracellular matrix (such as

collagen I and III). Two studies also observed markers that can contribute to angiogenesis, such as VEGF (vascular endothelial growth factor) [9,20].

Regarding the relative gene expression level of adhesion-related proteins, Gulati et al., 2020 [9] showed that the expression of integrin β 1 (important receptors mediating cellular binding onto the implant surface) is increased for hGFs seeded on anodized surfaces with 60 and 75 nm diameter NP compared to control surfaces at day 7. According to Xu et al., 2018 [17], hGF grown in contact with EA surfaces express FN and VCL genes encoding fibronectin (an important adhesion protein) and vinculin (an important cytoskeleton bonding protein associated with adhesion strength and migration) better at day 7 than hGF in contact with polished surfaces. Better gene expression related to adhesion is, most of the time, correlated to a better cell attachment. However, an overexpression of these genes may be related to reverse compensation. Ma et al., 2012 [20] showed better expression of ITGB at days 3, 6, and 9 on surfaces with NT than on polished surfaces, which was in contradiction with the results related to adhesion and proliferation. They concluded that the cells compensated for their lack of adhesion by expressing more mRNA (messenger ribonucleic acid) coding for β -integrin. Thus, it was preferable to complete the measurement of gene expression either by qualitative or quantitative analyses to ensure that the cell was correctly fulfilling its functions.

Gulati et al., 2020 [9] showed that hGFs in contact with 60 nm and 75 nm diameter nanoporous EA surfaces expressed the angiogenesis-associated marker VEGF better at day 7 than hGFs grown in contact with control surfaces or in contact with surfaces with 50 nm diameter NP. Ma et al., 2012 [20] showed that hGFs in contact with anodized surfaces expressed VEGF significantly better than polished surfaces. However, they added that an overexpression of this growth factor might reflect the persistence of inflammatory mechanisms or edema unfavorable to healing.

Collagen is the major component of extracellular matrices in gingival connective tissue and especially COL-1. The correct gene expression and production of COL-1 and/or COL-3 suggests that the surface on which the cells are cultured optimizes their capacity to secrete components essential for the adhesion, healing, and maintenance of homeostasis. All the studies that evaluated COL-1 and/or COL-3 mRNA expression and collagen secretion agreed that hGF cultured on anodized surfaces gave better results than hGFs seeded on conventional Ti substrates [8,12,14,17–19]. EA surfaces could favorably influence hGFs' function. Despite the enhanced production of collagen fibers, the latter was not necessarily arranged in a favorable manner relative to the surface. Ideally, the optimal surface would stimulate a perpendicular fiber arrangement to mimic the anatomy of the peri-implant tissue in front of a natural tooth. It is very difficult to recreate this *in vitro* condition, and one of the studies included established an electrophoretic method for the perpendicular implantation of collagen into TNT15. They showed an overhead view of NT surfaces COL-1 as nanodots indicating the perpendicular attachment.

3.5.2. Biological Behavior of Human Gingival Epithelial Cells (hGECs) to Anodized Surfaces

The three studies that investigated the behavior of hGECs on NT surfaces reported similarly negative results. Wang and al. 2020 showed on fluorescence images that NT surfaces decreased the number of attached cells after 4 h compared to the control surface [13]. After 48 h of culturing hGECs in contact with an NT surface (100 nm diameter) without functionalization, the LAMA3 and ITGB4 expression levels (which are the major components of hemidesmosome and basement membrane) were decreased compared with those cultured on the control surface. In a consistent way, SEM observations displayed that hGECs present an elongated irregular shape instead of a spherical one with very few filopodia. Interestingly, Xu et al., 2018 [17] described a morphological shape favorable to adhesion with lamellipodia anchoring on the EA surfaces, but gene expression relating to adhesion after 7 days was lower on NT surfaces than on polished control, as was cell proliferation. Nojiri et al., 2019 indicated that on NT surfaces without collagen grafting, hGECs exhibited round-up morphology signifying weak adhesion [15].

3.5.3. Multi-Functional Surfaces

In order to amplify the bioactivity of nano-tubular surfaces and simultaneously boost anti-bacterial activity, some authors have proposed different surface functionalizations. Two main modifications may be considered, whether by the chemical reactivity of the surface via the reactive sites (H^+ , OH) (Figure 6a) or by the shape of the NT/NP that acts as a reservoir (Figure 6b). Thus, the authors filled the NP/NT with growth factors or anti-bacterial agents, or performed biological coatings/depositing by grafting peptides, proteins, or nanoparticles. Sometimes, both these modifications were performed [21].

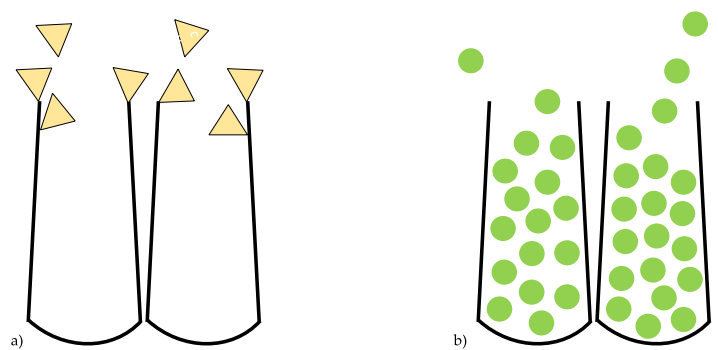


Figure 6. Various therapeutic and bioactivity enhancements performed on nanotubes. Adapted from Guo T et al., 2021. (a) illustrates how the reactive site on the surface may be used to graft different coatings (like nanoparticles or biopolymer); (b) illustrates how different substances may be incorporated into NT (as a growth factor, nanoparticles, anti-bacterial drugs) in order to ensure progressive delivery.

- Therapeutic delivery

Thanks to the hollow-core structure, NT and Np may be used as reservoirs by loading different agents. Liu et al., 2014 [18] reported that a BSA (bovine serum albumin) coating positively affects early-stage adhesion, enhances cell spreading, and promotes COL-1 expression of hGFs even if BSA coating suppresses COL-1 secretion at all-time points compared to NT surfaces and polished control. Ma et al., 2012 [20] functionalized their EA surfaces, whose NT were about 500 nm long, with fibroblast growth factors (FGF) which are proteins that activate cell multiplication and function. They showed that hGFs adhesion is better on functionalized surfaces than on simply anodized surfaces. On the other hand, surfaces functionalized with FGF were favorable for the adhesion and proliferation of hGF only at an optimum concentration. Above this concentration (500 ng/mL), the functionalization became detrimental for adhesion. The authors added that the release of the substances loaded was inevitable and that the effect did not continue over time. The length and the diameter of the NT regulated release behavior over time.

- Polymers/biomolecule/nanoparticles conjugation and coating

Synthetic or natural biopolymers and nanoparticles can be grafted using the reactivity of the surface hydroxyl groups located on the NT arrays.

As a natural biopolymer, a chitosan/collagen coating containing a plasmid pLAMA3-CM encoding a motif of the C-terminal globular domain of LAMA3 (which is associated with the formation of hemidesmosomes HD) was proposed to modify EA surfaces with NT [13]. Following 48 h of culture, hGECs cultured on functionalized NT surfaces effectively took up the incorporated plasmids, resulting in better attachment and the formation of HD compared to simply NT surfaces.

Similarly, another study [15] attached collagen protrusion on NT surfaces using different methods and analyzed the bonding stability of the collagen after sonication cycles by

FTIR-ATR. They reported that a stable bond was achieved between the EA surfaces and collagen despite drastic ultrasonication.

Xu et al., 2018 [17] modified EA surfaces with calcium phosphate (CaP) coating. They showed that hGECs and hGFs adhesion and proliferation were better on NT surfaces coated with CaP compared with simply NT surfaces.

In order to develop a surface with antimicrobial properties, Ma et al., 2011 [21] immobilized Ag nanoparticles associated with a growth factor (FGF-2) coating. They show that the adherence ratio of hGFs and proliferation was higher than those on the polished or simply NT surfaces. The immobilization of FGF-2 can offer various cell-substrate contact areas and reverse the negative effect due to the NT array. This surface can upregulate type I collagen expression and ITGB at days 3 and 6 compared to polished or NT surfaces. They concluded that this modified surface has potential use in dental implant abutment. Another study [11] developed a novel implant surface of TiO₂ decorated with gold nanoparticles (Au) due to their anti-bacterial properties. Indeed, the adjunction of Au particles enhanced the photocatalytic potential of TNT upon visible-light irradiation. They reported that Au nanoparticles were absorbed onto the tube wall located deep inside the tubular structure. This incorporation of Au on NT surfaces greatly improved hGF response as adhesion, migration, and proliferation.

- Crystalline structure

After EA, Wang et al., 2020 [8] annealed the Ti specimen under specific hydrogen conditions in order to obtain hydrophilic surfaces. They showed that these modified surfaces enhanced the adhesion of hGFs rapidly and improved the relative gene expression level and ECM synthesis of the hGFs. Interestingly, they performed a wound-healing assay to study the effect of the EA surfaces on hGF migration. They concluded that cells on EA surfaces modified by a thermal hydrogenation technique show a faster migration speed than those on the control Ti surfaces. They also observed after immunofluorescence staining that cell morphology and cytoskeletal actin filaments are better organized when hGFs are cultured on EA and treated surfaces compared to control.

To sum up, because all the included studies exhibited a positive influence after functionalization, such as biological coating, the incorporation of anti-bacterial agents, or heat treatment, the modification of EA Ti surfaces seems to be the key for taking full advantage of the process.

4. Conclusions

Within the limitations of this systematic review based on in vitro studies, it can be safely speculated that EA Ti surfaces influence the bioactivity of the compound. The modified EA surfaces improve hGFs response and thus probably positively influence connective tissue regeneration compared to traditional polished or machined Ti surfaces, but negatively influence hGECs behavior. Regarding hGFs, this positive influence in terms of adhesion, proliferation, and functions is only true if the surface's characteristics such as morphology, roughness, chemistry, and energy are optimal at the nanoscale. Even though it remains difficult to identify an optimal morphology for enhanced cell behavior, it can be assumed that the pore diameter, as well as the wall thickness, are the key factors. An ideal pore size seems to be situated between 70 and 120 nm. Above a certain diameter, hydrophilicity is a disadvantage for the bioactivity of hGFs. In the case of NT, the wall thickness must be at least 15 nm to anchor the cytoplasmic extensions. In the case of NP, the thickness between the walls prevails. A nano-tubular morphology is favorable for depositing anti-bacterial agents or growth factors into the length of the tube. However, it has been reported that the NP structure is more mechanically stable than NT. It is difficult to conclude on the optimum crystallinity of the oxide layer to promote the bioactivity of hGFs even if it seems that an anatase form is preferable.

To achieve this ideal ordered NT or NP surface and ensure the best performance, anodization conditions such as voltage, time, electrolyte (nature, composition, viscosity, age, acidity), and temperature must be optimized. Associating NT or NP with other

modifications may be considered systematically. Indeed, all the studies, including a preliminary preparation of the Ti surface before anodization as well as a post-modification such as functionalization, showed better biological results for anodized and functionalized surfaces than for anodized surfaces alone. EA surfaces associated with a biological coating positively influence both hGFs and hGECs behavior and thus may improve the biological phenomena that can occur between surfaces and the gingival cells compared to only EA.

Although the score-based method allowed determining the real effectiveness of the included studies, the mechanical stability of the TiO₂ layer needs to be further elucidated before clinical investigation in humans. Lastly, it is important to add that although biofilm formation and bacterial adhesion were not the subjects of the present review, EA surfaces may also affect microbial colonization and biofilm formation.

Author Contributions: Conceptualization, M.-J.C. and O.F.; methodology, M.-J.C., E.M. and O.F.; software, M.-J.C.; validation, P.P. and P.D. and O.F.; writing—original draft preparation, M.-J.C.; supervision, O.F. and N.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Karan Gulati, who generously gave images from his research, and Corinne Dupuy and Pierre-Augustin Crenn for the design of the 3D images.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Corvino, E.; Pesce, P.; Mura, R.; Marcano, E.; Canullo, L. Influence of Modified Titanium Abutment Surface on Peri-implant Soft Tissue Behavior: A Systematic Review of In Vitro Studies. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2020**, *35*, 503–519. [\[CrossRef\]](#)
- Canullo, L.; Annunziata, M.; Pesce, P.; Tommasato, G.; Nastri, L.; Guida, L. Influence of abutment material and modifications on peri-implant soft-tissue attachment: A systematic review and meta-analysis of histological animal studies. *J. Prosthet. Dent.* **2021**, *125*, 426–436. [\[CrossRef\]](#)
- Guo, T.; Gulati, K.; Arora, H.; Han, P.; Fournier, B.; Ivanovski, S. Orchestrating soft tissue integration at the transmucosal region of titanium implants. *Acta Biomater.* **2021**, *124*, 33–49. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Macak, J.M.; Tsuchiya, H.; Taveira, L.; Ghicov, A.; Schmuki, P. Self-organized nanotubular oxide layers on Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V formed by anodization in NH₄F solutions. *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, *75*, 928–933. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Demetrescu, I.; Pirvu, C.; Mitran, V. Effect of nano-topographical features of Ti/TiO₂ electrode surface on cell response and electrochemical stability in artificial saliva. *Bioelectrochemistry Amst. Neth* **2010**, *79*, 122–129. [\[CrossRef\]](#)
- Kunrath, M.F.; Diz, F.M.; Magini, R.; Galárraga-Vinueza, M.E. Nanointeraction: The profound influence of nanostructured and nano-drug delivery biomedical implant surfaces on cell behavior. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2020**, *284*, 102265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *J. Clin. Epidemiol.* **2021**, *134*, 178–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wang, C.; Wang, X.; Lu, R.; Gao, S.; Ling, Y.; Chen, S. Responses of human gingival fibroblasts to superhydrophilic hydrogenated titanium dioxide nanotubes. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *198*, 111489. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gulati, K.; Moon, H.-J.; Kumar, P.T.S.; Han, P.; Ivanovski, S. Anodized anisotropic titanium surfaces for enhanced guidance of gingival fibroblasts. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2020**, *112*, 110860. [\[CrossRef\]](#)
- Xu, Z.; He, Y.; Zeng, X.; Zeng, X.; Huang, J.; Lin, X.; Chen, J. Enhanced Human Gingival Fibroblast Response and Reduced Porphyromonas gingivalis Adhesion with Titania Nanotubes. *BioMed Res. Int.* **2020**, 5651780. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zheng, X.; Sun, J.; Li, W.; Dong, B.; Song, Y.; Xu, W.; Zhou, Y.; Wang, L. Engineering nanotubular titania with gold nanoparticles for antibiofilm enhancement and soft tissue healing promotion. *J. Electroanal. Chem. B* **2020**, *871*, 114362. [\[CrossRef\]](#)
- Llopis-Grimalt, M.A.; Amengual-Tugores, A.M.; Monjo, M.; Ramis, J.M. Oriented Cell Alignment Induced by a Nanostructured Titanium Surface Enhances Expression of Cell Differentiation Markers. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1661. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, J.; He, X.-T.; Xu, X.-Y.; Yin, Y.; Li, X.; Bi, C.-S.; Hong, Y.-L.; Chen, F.-M. Surface modification via plasmid-mediated pLAMA3-CM gene transfection promotes the attachment of gingival epithelial cells to titanium sheets in vitro and improves biological sealing at the transmucosal sites of titanium implants in vivo. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 7415–7427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ferrà-Cañellas, M.D.M.; Llopis-Grimalt, M.A.; Monjo, M.; Ramis, J.M. Tuning Nanopore Diameter of Titanium Surfaces to Improve Human Gingival Fibroblast Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2881. [\[CrossRef\]](#)

15. Nojiri, T.; Chen, C.-Y.; Kim, D.M.; Da Silva, J.; Lee, C.; Maeno, M.; McClelland, A.A.; Tse, B.; Ishikawa-Nagai, S.; Hatakeyama, W.; et al. Establishment of perpendicular protrusion of type I collagen on TiO₂ nanotube surface as a priming site of peri-implant connective fibers. *J. Nanobiotechnology* **2019**, *17*, 34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Gulati, K.; Moon, H.-J.; Li, T.; Kumar, P.S.; Ivanovski, S. Titania nanopores with dual micro-/nano-topography for selective cellular bioactivity. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *91*, 624–630. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Xu, R.; Hu, X.; Yu, X.; Wan, S.; Wu, F.; Ouyang, J.; Deng, F. Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 5045–5057. [\[CrossRef\]](#)
18. Liu, X.; Zhou, X.; Li, S.; Lai, R.; Zhou, Z.; Zhang, Y.; Zhou, L. Effects of titania nanotubes with or without bovine serum albumin loaded on human gingival fibroblasts. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 1185–1198. [\[CrossRef\]](#)
19. Guida, L.; Oliva, A.; Basile, M.A.; Giordano, M.; Natri, L.; Annunziata, M. Annunziata. Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces. *J. Dent.* **2013**, *41*, 900–907. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhang, Y.; Ma, Q.; Chu, P.; Mei, S.; Ji, K.; Jin, L. Concentration- and time-dependent response of human gingival fibroblasts to fibroblast growth factor 2 immobilized on titanium dental implants. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 1965–1976. [\[CrossRef\]](#)
21. Ma, Q.; Mei, S.; Ji, K.; Zhang, Y.; Chu, P.K. Immobilization of Ag nanoparticles/FGF-2 on a modified titanium implant surface and improved human gingival fibroblasts behavior. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *98*, 274–286. [\[CrossRef\]](#)
22. Guo, T.; Oztug, N.A.K.; Han, P.; Ivanovski, S.; Gulati, K. Old is Gold: Electrolyte Aging Influences the Topography, Chemistry, and Bioactivity of Anodized TiO₂ Nanopores. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 7897–7912. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Guo, T.; Oztug, N.A.K.; Han, P.; Ivanovski, S.; Gulati, K. Influence of sterilization on the performance of anodized nanoporous titanium implants. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *130*, 112429. [\[CrossRef\]](#)
24. Zhao, L.; Mei, S.; Wang, W.; Chu, P.K.; Wu, Z.; Zhang, Y. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2055–2063. [\[CrossRef\]](#)
25. Subramani, K.; Jung, R.E.; Molenberg, A.; Hammerle, C.H.F. Biofilm on dental implants: A review of the literature. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2009**, *24*, 616–626.
26. Fu, Y.; Mo, A. A Review on the Electrochemically Self-organized Titania Nanotube Arrays: Synthesis, Modifications, and Biomedical Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, 187. [\[CrossRef\]](#)
27. Kafshgari, M.H.; Goldmann, W.H. Insights into Theranostic Properties of Titanium Dioxide for Nanomedicine. *Nano-Micro Lett.* **2020**, *12*, 22. [\[CrossRef\]](#)
28. McNamara, L.E.; Sjöström, T.; Seunarine, K.; Meek, R.D.; Su, B.; Dalby, M.J. Investigation of the limits of nanoscale filopodial interactions. *J. Tissue Eng.* **2014**, *5*, 2041731414536177. [\[CrossRef\]](#)
29. Mohamed, A.E.R.; Kasemphaibulsuk, N.; Rohani, S.; Barghi, S. Fabrication of titania nanotube arrays in viscous electrolytes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 1998–2008. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Kearns, V.R.; Williams, R.L.; Mirvakily, F.; Doherty, P.J.; Martin, N. Guided gingival fibroblast attachment to titanium surfaces: An in vitro study. *J. Clin. Periodontol.* **2013**, *40*, 99–108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Gristina, A.G. Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **1987**, *237*, 1588–1595. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Guo, T.; Gulati, K.; Arora, H.; Han, P.; Fournier, B.; Ivanovski, S. Race to invade: Understanding soft tissue integration at the transmucosal region of titanium dental implants. *Dent. Mater.* **2021**, *37*, 816–831. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

III-3 Nano-structuration d’une surface de titane obtenue par LBM : Synthèse puis caractérisation morphologique & physico-chimique

À l’issue de cette revue systématique, il est possible de souligner que les surfaces de titane nanostructurées par oxydation anodique améliorent la réponse *in vitro* des fibroblastes gingivaux par rapport aux surfaces conventionnelles de titane, à la condition que ces surfaces présentent des caractéristiques morphologiques et chimiques optimisées. Dans cette optique, il est possible de retenir que les NT ou NP doivent idéalement présenter un diamètre compris entre 70 et 120 nm, une épaisseur de paroi (ou un espace inter-pores) de plus de 15 nm et des longueurs plutôt « courtes » de l’ordre de 500 nm. Si la mouillabilité de surface est favorable pour la réponse biologique, un certain niveau d’hydrophilie ne doit pas être dépassé. Lorsque l’anodisation est associée à des processus de fonctionnalisation, elle influence également positivement le comportement des cellules épithéliales. Ces *coatings* biologiques seraient donc à systématiser pour des applications biomédicales odontologiques en rapport avec les tissus mous. Les surfaces anodisées et fonctionnalisées s’avèrent très prometteuses pour optimiser l’intégration des cellules gingivales autour du composant transgingival et ces premières conclusions seront à confronter dans un avenir proche avec les résultats issus des études *in vivo*

où la complexité des mécanismes biologique sera déterminante.

Néanmoins, avant de passer à des tests *in vivo*, ces conclusions prometteuses sont à nuancer et des **limites** concernant le protocole expérimental et notamment **les surfaces de titane utilisées** dans ces études *in vitro* sont à exposer.

Tout d'abord, les études sélectionnées dans ce travail n'étudient que la modification par anodisation de **titane pur**. Cela aboutit théoriquement à des surfaces homogènes avec la présence de NT ou de NP formés de manière uniforme sur toute la surface de l'échantillon. Seulement les PPIP sont réalisées en alliage de titane Ti6Al4V alpha-bêta et non en titane pur et il a été rapporté que la phase bêta présente sur du Ti polycristallin empêchait la formation de NT ou de NP (77,78). En effet, il se peut que les lignes de courant qui se créent pendant l'attaque électrochimique ne soient pas identiques d'une zone à l'autre en fonction de la composition chimique des phases respectives (79), de la taille des grains, mais également en fonction de leur orientation cristallographique (80).

Deuxièmement, toutes les pièces anodisées dans les études sélectionnées sont obtenues quasiment exclusivement par **usinage à partir d'un bloc de titane coulé**. Seule une étude propose une modification d'un titane pur obtenu par SLM (81). Cette étude ne contient pas d'information en rapport avec la faisabilité de l'anodisation sur des pièces issues de ce procédé additif. Puisque la solution SLM pour la mise en forme de PPIP est déjà une réalité, il convient de se demander si la microstructure caractéristique en latte (au lieu de nodules pour l'alliage moulé et traité thermiquement) et l'orientation cristallographique peuvent influencer cette modification de surface.

Enfin, toutes ces études étudient la bioactivité des surfaces anodisées à travers la réponse cellulaire à une échelle macroscopique. Aucune étude ne propose de s'intéresser aux phénomènes qui apparaissent à une échelle nanométrique. Pourtant, les premières interactions biologiques lors de la mise en place d'un biomatériau dans le milieu vivant sont régies par l'adsorption de protéines à la surface de ce dernier et donc par des phénomènes intervenant à l'échelle du nanomètre. La chimie particulière des surfaces anodisées et la réactivité spécifique qui en découle est primordiale puisque cette réactivité particulière va se répercuter sur l'adsorption de petites comme de grosses entités moléculaires, allant d'ions simples constitués de quelques atomes à des biomolécules de grande taille comme des protéines. De plus, cette adsorption particulière sur de telles surfaces jouera un rôle sur les fonctionnalisations pour atteindre des propriétés spécifiques (colonisation cellulaire, relargage d'entités bioactives).

Ainsi, dans le but d'envisager à la fois la faisabilité de cette technique pour la modification de la surface de Ti6Al4V obtenues par SLM tout en améliorant la compréhension des phénomènes d'adsorption qui peuvent exister entre une surface nanotubulaires et le milieu biologique à une toute petite échelle, le but de cette dernière partie est de :

- 1) De modifier une surface de Ti6Al4V obtenue par SLM par oxydation anodique puis de la caractériser afin de comprendre comment la **microstructure** inhérente au procédé et **l'orientation cristallographique des grains** influencent la morphologie des nanotubes.
- 2) D'étudier **la réactivité des surfaces SLM anodisées** afin de mieux comprendre la supériorité d'une telle surface par rapport aux surfaces conventionnelles.

Cette partie de l'étude a été réalisée dans le cadre d'un **Poste d'accueil** APHP au sein du laboratoire Procédés Ingénierie Matériaux et Procédés (PIMM. CNRS - UMR 8006) aux Arts et Métiers (ENSAM) ; en collaboration avec l'ICMPE (Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est).

III-3-1 Caractérisation de la morphologie des nanotubes sur une surface de Ti6Al4V obtenue par SLM

III-3-1-1 Préparation des échantillons

Des disques de dimensions 20 x 8mm ont été fabriqués à partir d'une poudre métallique de Ti6Al4V ELI de grade 23 : la CT Powder Range Ti64 F disponible chez Carpenter Additive, dont la composition est présentée dans le tableau 2 ci-dessous. Comme il a été indiqué dans les parties précédentes, cet alliage est celui qui est couramment utilisée dans le domaine médical.

Tableau 2 : Composition de la poudre utilisée selon la fiche de sécurité du fabricant.

Eléments		Minimum wt%	Maximum wt%
Al	Alumimium	5.5	6.5
C	Carbon		0.08
H	Hydrogen		0.012
Fe	Iron		0.25
N	Nitrogen		0.05
O	Oxygen		0.13
Ti	Titanium	Balance	
V	Vanadium	3.5	4.50

La distribution granulométrique de la poudre montre des diamètres D_{10} , D_{50} et D_{90} de 18, 34 et 60 μm respectivement (Figure 27.A). La poudre est atomisée à l'argon et présente une bonne sphéricité (Figure 27.B) malgré quelques satellites agglomérés.

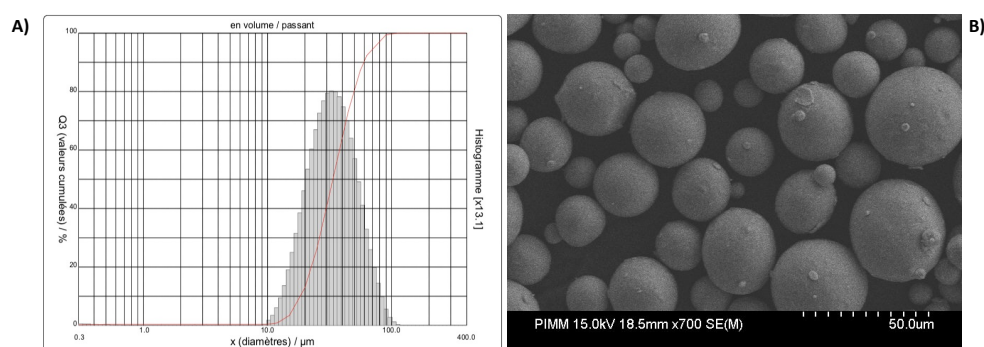


Figure 27 : A) Distribution granulométrique de la poudre. B) Visualisation de la shpéricité au MEB de la poudre.

La machine utilisée est une SLM 125 HL de la marque SLM Solutions (Figure 28). Elle est équipée d'un laser IPG Yb-YAG d'une longueur d'onde de 1070 nm et d'un racleur polymère souple pour étaler la poudre. Le modèle de la machine utilisée et les paramètres de fabrication sont indiqués figure 28.



Paramètres de fabrication sélectionnés	
Remplissage	P=275 W v=1100 mm/s
Border	P=100 W v=450 mm/s
Épaisseur de couche	30 µm
Pattern	Non
Hatch	120 µm
Orientation d'impression	50° par rapport au plateau

Figure 28 : Machine SLM 125 HL et paramètres de fabrication.

Les pièces fabriquées sont des disques de 2 cm de diamètre et 8 mm d'épaisseur. L'orientation de 50° par rapport au plateau a été choisie pour reproduire les conditions « cliniques ». En effet, il faut tenir compte de l'orientation de fabrication de PPIP : ces dernières sont construites de la partie la plus occlusale à la plus apicale, c'est-à-dire du haut vers le bas, afin d'optimiser dans un second temps l'accès à la connectique implantaire par les fraises d'usinage (Figure 29). Ainsi la partie transgingivale se situe dans un angle allant de 30 à 50° par rapport au plateau en fonction du type de dent et du berceau gingival. La surface d'intérêt des disques élaborés pour ce travail est la face supérieure du disque.

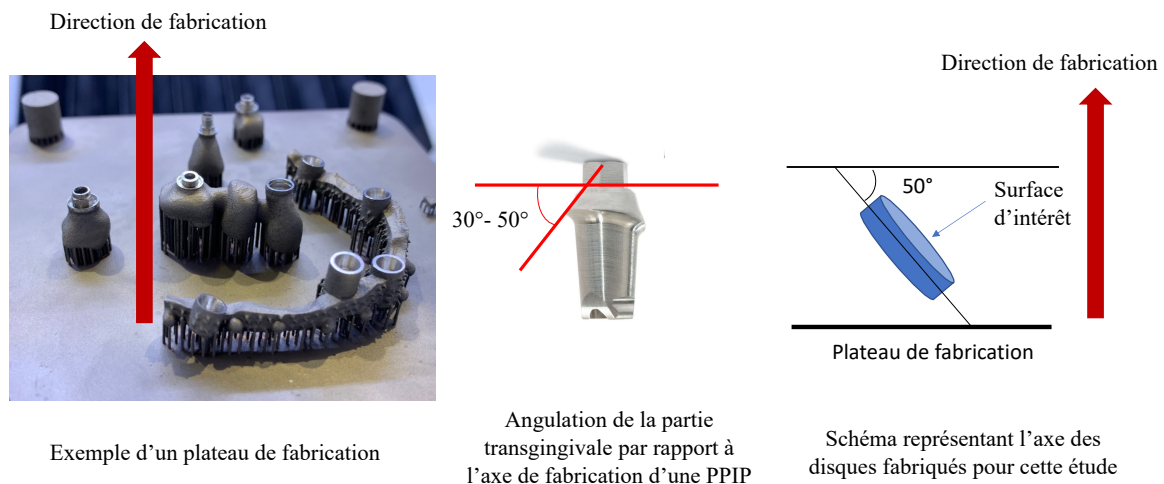


Figure 29 : Explication du choix de l'orientation d'impression des disques.

Comme l'a expliqué le chapitre 1, les échantillons ont ensuite subi un post traitement thermique directement sur leur plateau afin à nouveau de respecter les conditions réelles de fabrication des PPIP et atteindre une ductilité acceptable en odontologie prothétique. Le traitement thermique était le suivant :

- Chauffage à 10-12°C/min
- Maintien 2 h à 880°C
- Refroidissement lent dans le four (non régulé) jusqu'à 200°C puis sortie du four.

Les échantillons ont ensuite été décrochés puis passés aux ultra-sons pour éliminer les particules non fusionnées avant les analyses.

Afin d'entamer les premiers travaux en rapport avec l'anodisation d'une surface de Ti6AL4V obtenues par SLM, **nous avons décidé de commencer par la modification de surfaces de Ti6Al4V mise en forme par SLM puis préalablement polies mécaniquement.**

La première étape de la démarche a été la préparation de la surface d'intérêt par polissage mécanique afin de permettre une observation à l'EBS (Electron Back Scattered Diffraction ou Diffraction d'électrons rétrodiffusés). Trois échantillons (n=3) ont suivi la même gamme de polissage dont les étapes sont décrites dans le tableau 3.

Tableau 3 : Gamme de polissage subis par les échantillons pour les observations métallographiques.

Abrasif	Force de pression centrale (N)	Vitesse de rotation de la roue de travail (tour/min)	Vitesse de rotation de la tête de polissage (tour/min)	Type de rotation de la roue de travail par rapport à la tête de polissage	Vitesse d'écoulement	Temps
320	15	300	150	Horaire	NC	Jusqu'à planéité
1200	15	300	150	Horaire	NC	45s
Diamant 9 µm	20	150	150	Horaire	NC	5 minutes
OPS (SiO ₂) 0.05 µm + 20% H ₂ O ₂	20	150	150	Horaire	0.5ml/20s au début puis 2ml/10s	5 minutes
OPS (SiO ₂) 0.05 µm + 20% H ₂ O ₂	5	50	50	Antihoraire	0.5ml/20s au début puis 2ml/10s	25 minutes

Il a été décidé en parallèle, de traiter identiquement un échantillon contrôle (n=1) obtenu par usinage à partir de l'alliage de grade 5 utilisé dans le chapitre 2 : le Copra. Ces 4 échantillons ont servi pour la caractérisation morphologique.

III-3-1-2 Protocole expérimental et moyens d'analyse des échantillons

Une analyse en diffraction des rayons X (DRX) sur un échantillon SLM brut, avant et après traitement thermique, a été effectuée pour analyser la microstructure. Les diagrammes ont été acquis sur un diffractomètre MPD PANalytical X'Pert Pro, alimenté par un générateur de rayons X Philips PW3040 / 60 et équipé d'un détecteur X'Celerator. Les données de diffraction sont acquises en exposant les échantillons à un rayonnement X issu d'une anode Cu-K α , de longueur d'onde caractéristique (λ) de 1,5418 Å (tension de 45 kV et courant de 40 mA). Les données ont été collectées sur une plage de 5-160° en 2 θ avec une taille de pas de 0,0130° en 2 θ et un temps nominal par pas de 120 secondes, en utilisant le détecteur X'Celerator en mode balayage.

L'identification et la quantification des phases, par intégration des pics de diffraction relatifs à chaque phase alpha ou bêta, ont été réalisées à l'aide du logiciel d'accompagnement X'Pert PANalytical High Score Plus conjointement avec la base de données ICDD Powder Diffraction File 2 (1999), ICDD Powder Diffraction File 4 - Minerals (2012), l'American Mineralogist

Crystal Structure Database (Mars 2010) et la base de données ouverte de cristallographie (www.crystallography.net).

Une fois que la face d'intérêt de quatre échantillons a été préparée par polissage mécanique selon le protocole présenté dans le tableau 3 (pour rappel, 3 échantillons obtenus par SLM et 1 échantillon contrôle mis en forme par usinage), cette face a été cartographiée au MEB en EBSD. L'EBSD est une technique d'analyse cristallographique locale basée sur l'exploitation des diagrammes de diffraction des électrons rétrodiffusés. Elle présente l'avantage de relier l'orientation cristallographique à la microstructure de l'échantillon. Il est possible ainsi, à partir de l'indexation des lignes de Kikuchi projetées sur le plan de la caméra EBSD, et issues du croisement des cônes de diffraction (Figure 30) d'établir des cartographies qui permettent une analyse de l'orientation cristallographique $\langle hkl \rangle$ de chaque grain par rapport à la surface analysée.

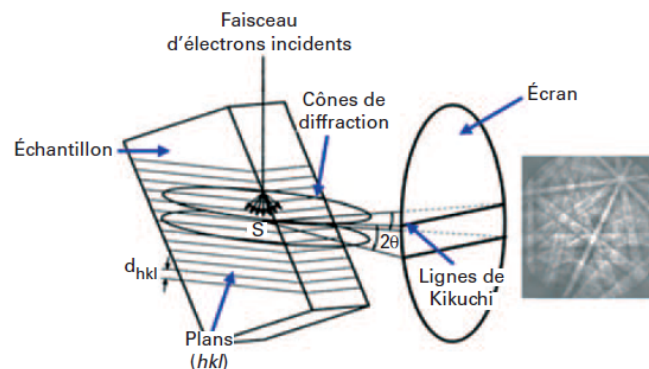


Figure 30 : Principe de l'analyse cristallographique locale par EBSD ; d'après Baudin 2010 (82).

Les images ont été réalisées avec un microscope Merlin de la marque Carl Zeiss doté d'un canon à émission de champ (FEG) Shottky. Le système est couplé à un spectromètre à dispersion en énergie des rayons X (EDS) avec une diode SDD X-Max de 50 mm² ainsi qu'une caméra CCD Nordlys Nano de la marque Oxford Instruments pour l'étude structurale par diffraction des électrons rétrodiffusés (EBSD). Ces équipements sont pilotés par l'interface AZtec Synergy Advanced.

Avant l'acquisition, un protocole a été mis au point afin de construire des zones quadrillées repérables sur les échantillons avant les cartographies EBSD (Figure 31). Des indentations ont ainsi été réalisées afin de construire des grilles dont chaque carré présentait un côté de 70 nm.

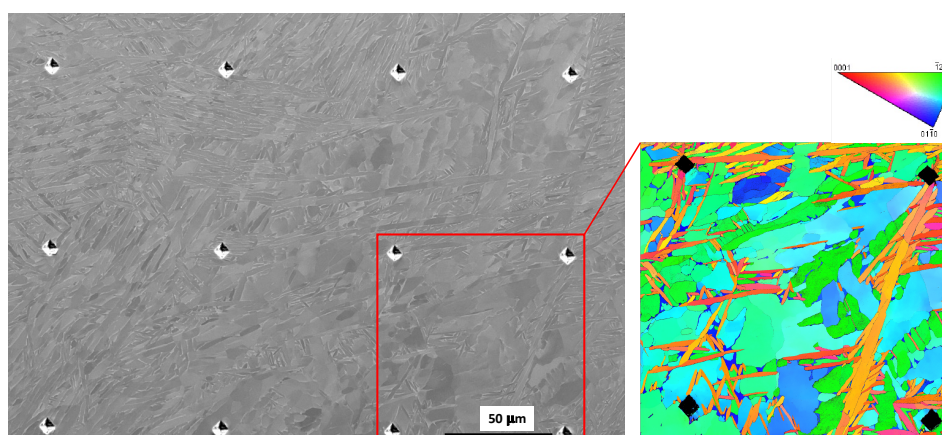


Figure 31 : Exemple d'un quadrillage permettant de délimiter 6 zones possibles d'exploration grâce à 12 indentations. Il a été décidé après observation de toutes les zones de cartographie à l'EBSD la zone délimitée par le carré rouge.

La zone la plus adéquate, c'est-à-dire sans contaminations de surface ou de polluants, a été sélectionnée puis cartographiée à l'EBSD. Les paramètres d'analyse ont varié au long de l'étude. Une fiche annexe située en fin de ce manuscrit permet de récapituler ces paramètres pour chaque acquisition. Les seuls paramètres qui n'ont pas évolué sont l'énergie du faisceau (20keV) et l'inclinaison de la platine à 70°. En revanche, le pas d'acquisition (la résolution spatiale des cartographies) a varié de 50 nm à 200 nm. À 200 nm par pixel, suffisamment de points étaient détectables pour les grains α même si les plus petits domaines de β étaient non perceptibles.

À l'issue de l'analyse EBSD, les échantillons ont été dégraissés dans un bain d'éthanol pendant 5 minutes aux ultra-sons. Ils ont ensuite été anodisés selon un protocole validé en amont pour permettre la formation de NT. Différentes tensions d'anodisation ont été imposées à chaque échantillon (10 V - 20 V - 30 V respectivement) pendant 1h dans un électrolyte contenant de l'acide acétique (1M), de l'acide fluorhydrique (0.5%) dans un mélange 50% Glycerol-50% H₂O. L'échantillon de contrôle a quant à lui été préparé dans les mêmes conditions et anodisé à 20V pendant 1 h. Le traitement des 4 échantillons est récapitulé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Présentation des différents échantillons et les paramètres associés.

Nom échantillon	Tension	Méthode de fabrication
SLM 10	10 V	SLM
SLM 20	20 V	SLM
SLM 30	30 V	SLM
Contrôle	20 V	Usinage

Un jour après l'anodisation, les zones préalablement cartographiées à l'EBSD ont été retrouvées grâce aux indentations. Des images de MEB à faible grossissement (x1000) ont été acquises dans le périmètre préalablement cartographié avec une tension d'accélération réglée à 15 kV. Ces images de MEB ont été superposées à celles issues de la cartographie EBSD à l'aide du logiciel Photoshop.

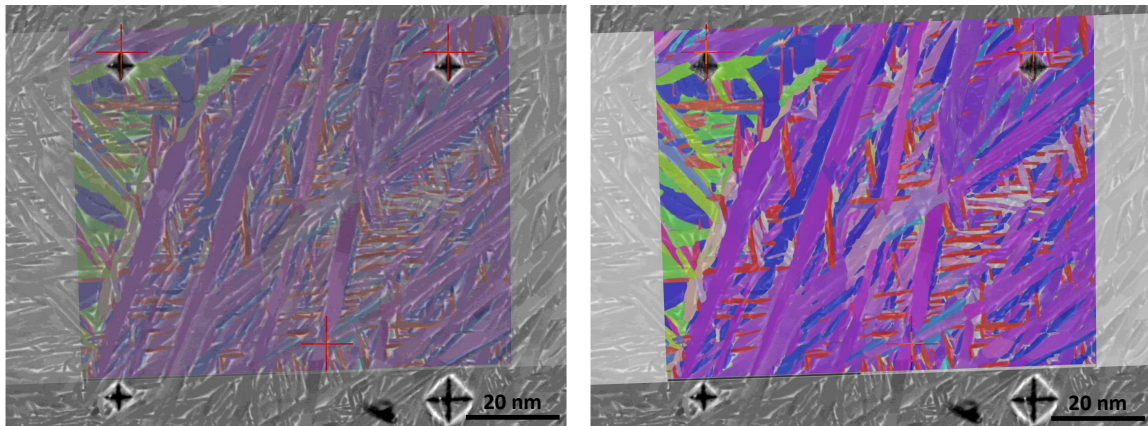


Figure 32 : Exemple de superposition de 2 acquisitions MEB/EBSD.

Grâce à cette superposition, il a été possible d'acquérir des images à plus forts grossissements ($\times 100.000$ et $\times 200.000$) dans des zones particulières où grâce à l'image issue de la cartographie EBSD, :

- la structure cristalline était connue (hexagonale compacte α ou cubique centrée β)
- l'orientation cristallographique locale des grains était connue.

Sur chaque image, les différents paramètres morphologiques des NT ont pu être mesurés, à savoir :

- le diamètre (moyenné sur $n=60$ mesures), au niveau du plus grand axe
- la circularité ($n=60$)
- le périmètre ($n=60$)
- la taille des parois, identifiée à partir de $n = 30$ mesures, réparties sur 10 NT où il a été décidé de mesurer la paroi dans la zone la plus fine, là où elle était la plus épaisse et dans une troisième zone standard
- la longueur (ou hauteur) des NT ($n=10$).

Les mesures ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse d'images Image J.

L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel Prism (GraphPad v7.0a). Un test de Student a été utilisé pour confronter les diamètres de NT obtenus sur les échantillons usinés et sur les NT obtenues sur les échantillons SLM ($\alpha=0.05$). Pour comparer les diamètres, la circularité et les périmètres, une ANOVA a été utilisée puisque le nombre de mesures était égal à 60, en admettant une distribution normale des données. Un $p < 0.05$ était considéré comme significatif.

III-3-1-3 Résultats de la caractérisation morphologique et discussion

Les spectres DRX des échantillons sont présentés ci-dessous (Figure 33) pour les phases α et β . Les pics obtenus montrent la présence exclusivement de la phase hexagonale α' avant traitement thermique. Après traitement thermique, les mêmes pics sont détectés mais ils correspondent à la phase α (et non plus α'), les deux phases étant trop proches cristallographiquement pour être discriminées en DRX. Par contre, on détecte également des pics de phase β en faible quantité estimée ici à 2%, qui traduisent bien l'effet du traitement thermique.

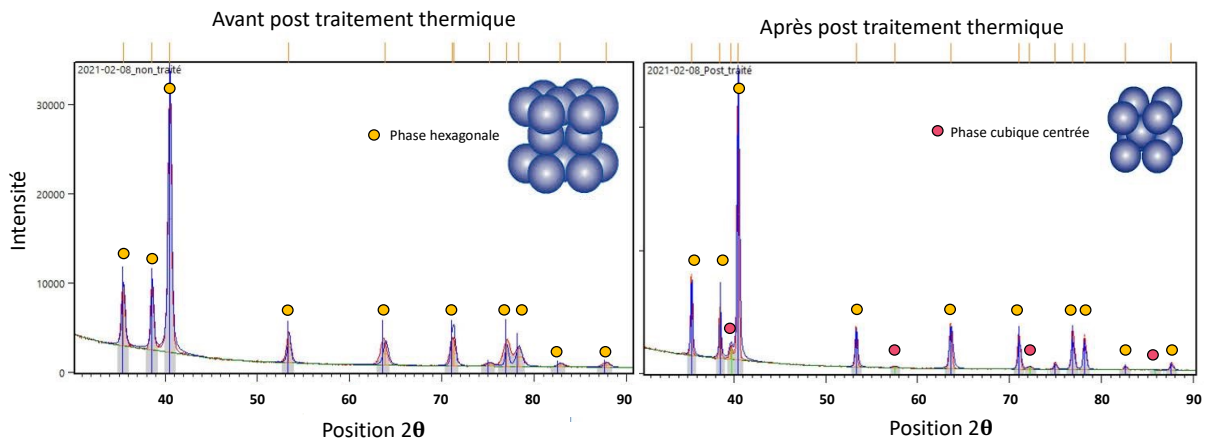


Figure 33 : Spectres DRX issus de l'analyse de l'échantillon avant et après post-traitements.

La figure 34 montre les cartographies EBSD des 4 types d'échantillons analysés.

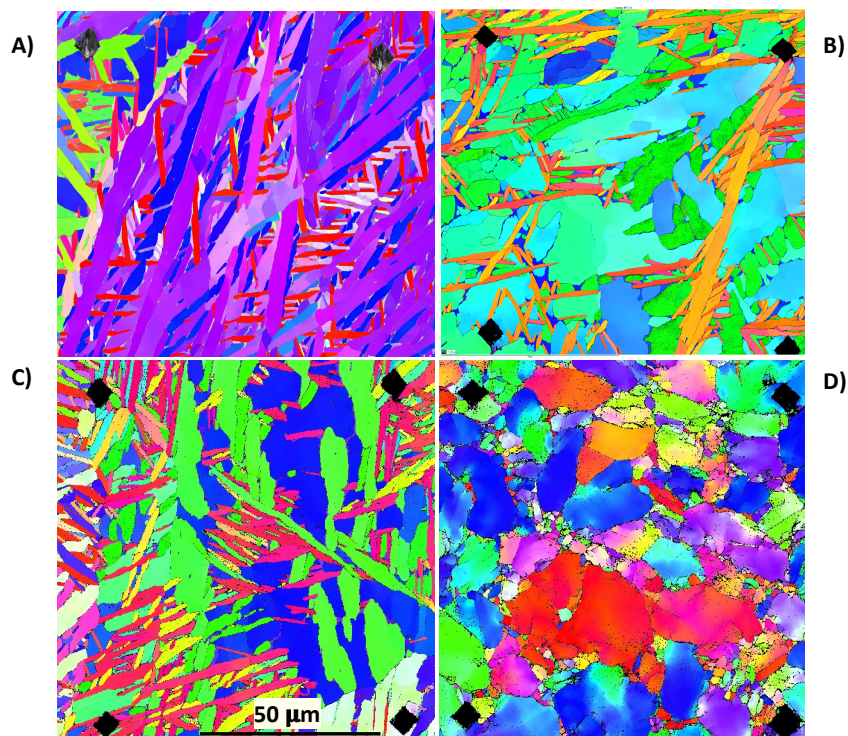


Figure 34 : Cartographies EBSD de la face supérieure des 4 échantillons avant anodisation selon la direction Z. A) B) C) échantillons obtenus par SLM ayant subis un post traitement D) échantillon de contrôle obtenu par usinage à partir d'un bloc de titane préalablement coulé.

Les échantillons SLM traités thermiquement (Figure 34 A;B;C) présentent une microstructure mixte, avec la présence à la fois de lattes (ou lamelles) plus ou moins fines mais aussi la présence de structures de plus gros grains α qui peuvent quasi-équiaxes (en bleu sur la figure B) ou plus allongés (en bleu sur Fig C). En revanche l'échantillon contrôle issu de fonderie (Figure 34 D) présente quant à lui une microstructure présentant des grains quasi-équiaxes, c'est à dire sans forme allongée.

- Influence de la microstructure sur la morphologie des NT

Tout d'abord il est possible d'affirmer que la formation des NT est dépendante de la microstructure : la phase alpha est entièrement recouverte de NT alors que la phase bêta présente des zones « creuses » qui peuvent qualitativement être associées à des zones de dissolution (Figure 35).

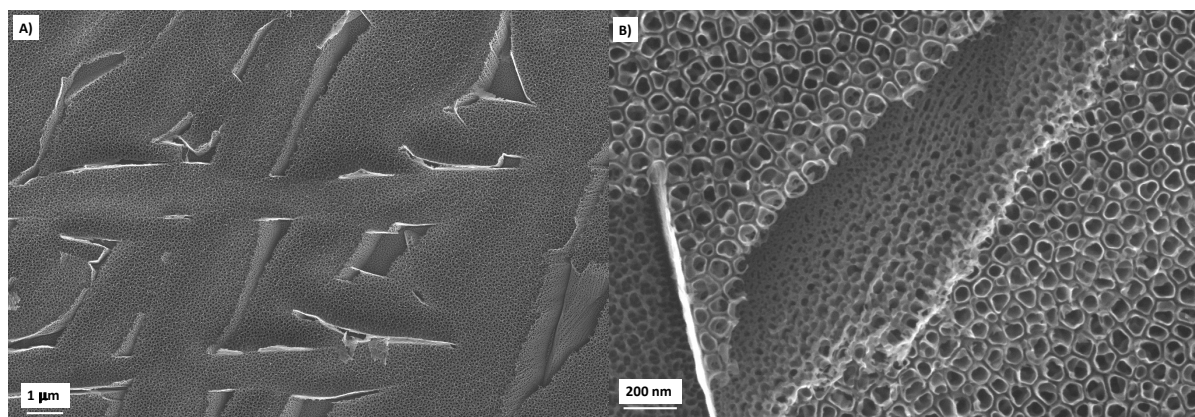


Figure 35 : A) Visualisation au MEB d'une surface SLM de Ti6Al4V obtenue par SLM anodisée (20V-1 h). Il est possible d'observer les anciennes lattes α où les NT se sont créés et des zones « dissoutes » correspondant à la phase β inter-lattes. B) Sur ces phases β , une structure en « nid d'abeille » poreuse est mise en évidence à plus fort grossissement.

Le même phénomène est retrouvé sur l'échantillon contrôle obtenu par usinage (Figure 36).

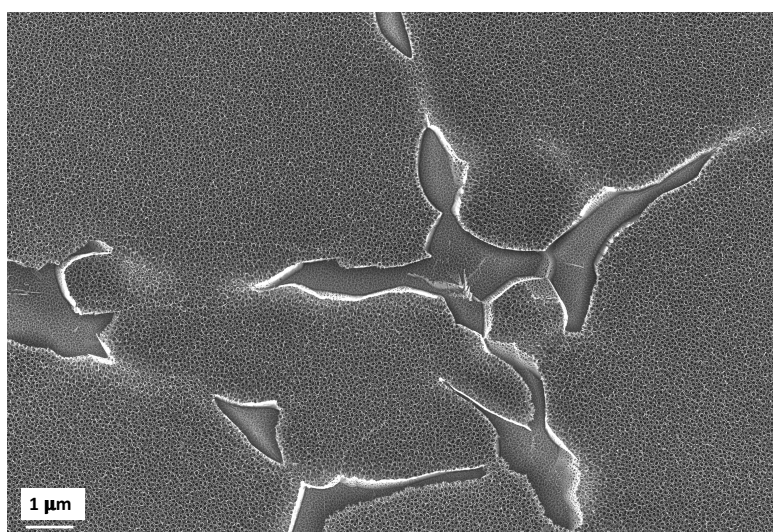


Figure 36 : Visualisation au MEB d'une surface de Ti6Al4V obtenue par usinage anodisée où il est possible d'observer que les NT se sont créés sur la structure équiaxe, alors que les joints de grains semblent dissous (20V-1 h).

Si ces observations ont déjà fait l'objet de rares études sur du Ti6Al4V obtenu par usinage à partir d'un bloc de titane préalablement coulé, c'est à notre connaissance encore rarement décrit pour une surface obtenue par SLM à partir d'une poudre de Ti6Al4V. Jusqu'à présent, la seule publication en rapport avec cette thématique rapporte effectivement une surface de Ti6Al4V SLM anodisée inhomogène sans proposer de véritable explication (83).

L'hypothèse la plus probable est en rapport avec la composition chimique des phases. En effet, la phase bêta β qui est plus riche en vanadium bêtagène (dont la quantité est estimée entre 5 et 25 wt% en fonction du traitement thermique (84)) doit induire une différence de potentiel

chimique par rapport à la phase α qui est plus riche en aluminium, au détriment de la phase β provoquant sa dissolution sélective dans le milieu réactif. Cette hypothèse est validée par l'analyse de la composition chimique en spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDS) qui a été réalisée en parallèle et dont les résultats sont présentés dans la figure 37.

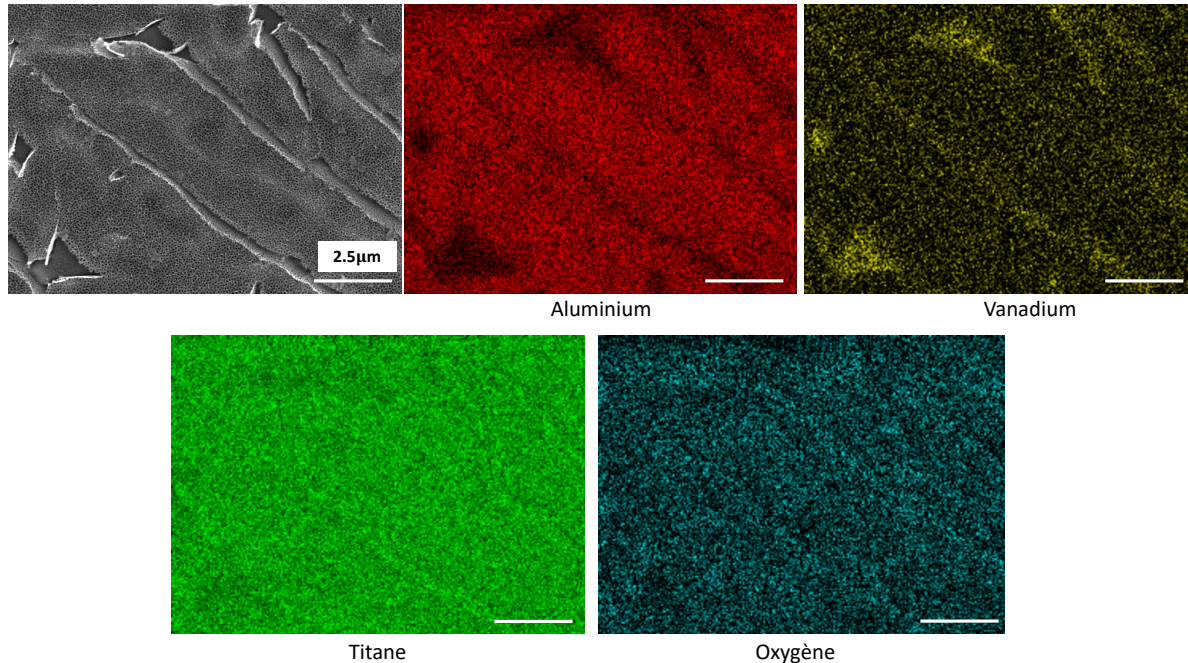


Figure 37 : Résultat de l'analyse EDS : présence d'enrichissement en V et de déplétion en Al dans les anciens joints de grains beta.

Ces cartographies EDS confirment l'enrichissement en vanadium entre les grains α , matérialisé par une émission lumineuse plus prononcée au niveau des joints de grains, donc des zones creusées lors de l'anodisation. *A contrario*, les phases où les NT se sont formés sont en moyenne plus riches en aluminium.

Cette dissolution préférentielle de la phase β doit être favorisée par le rapport de taille entre les fins interstices de β (partie anodique) et les gros grains α majoritaires (partie cathodique), ce qui augmente probablement la cinétique de dissolution. Ce phénomène est bien connu par exemple, en corrosion localisée par piqûres.

- Influence de la tension d'anodisation sur la morphologie des NT

Le diamètre des NT augmente avec la tension imposée aux surfaces SLM (Figure 38). Il a été rapporté en moyenne, à durée d'anodisation constante (1 h) un diamètre de 35 nm pour une tension d'anodisation $U = 10$ V, de 70 nm pour $U = 20$ V et de 98 nm pour $U = 30$ V. Ces valeurs sont cohérentes avec celles retrouvées dans la revue bibliographique précédemment exposée.

De la même façon, plus la tension imposée est importante, plus la longueur des nanotubes augmente, pour un temps équivalent. À 30 V, la longueur des nanotubes est en moyenne de 400 nm alors qu'elle descend à 240 nm à 20 V et à 170 nm à 10 V. Enfin, même si l'épaisseur des parois est très fine et par conséquent difficile à mesurer, il est possible de retenir que la tension d'anodisation influe également sur l'épaisseur de ces parois. Ces dernières varient de 3 à 9 nm, ce qui correspond en réalité à un nombre assez réduit de couches moléculaires de TiO_2 .

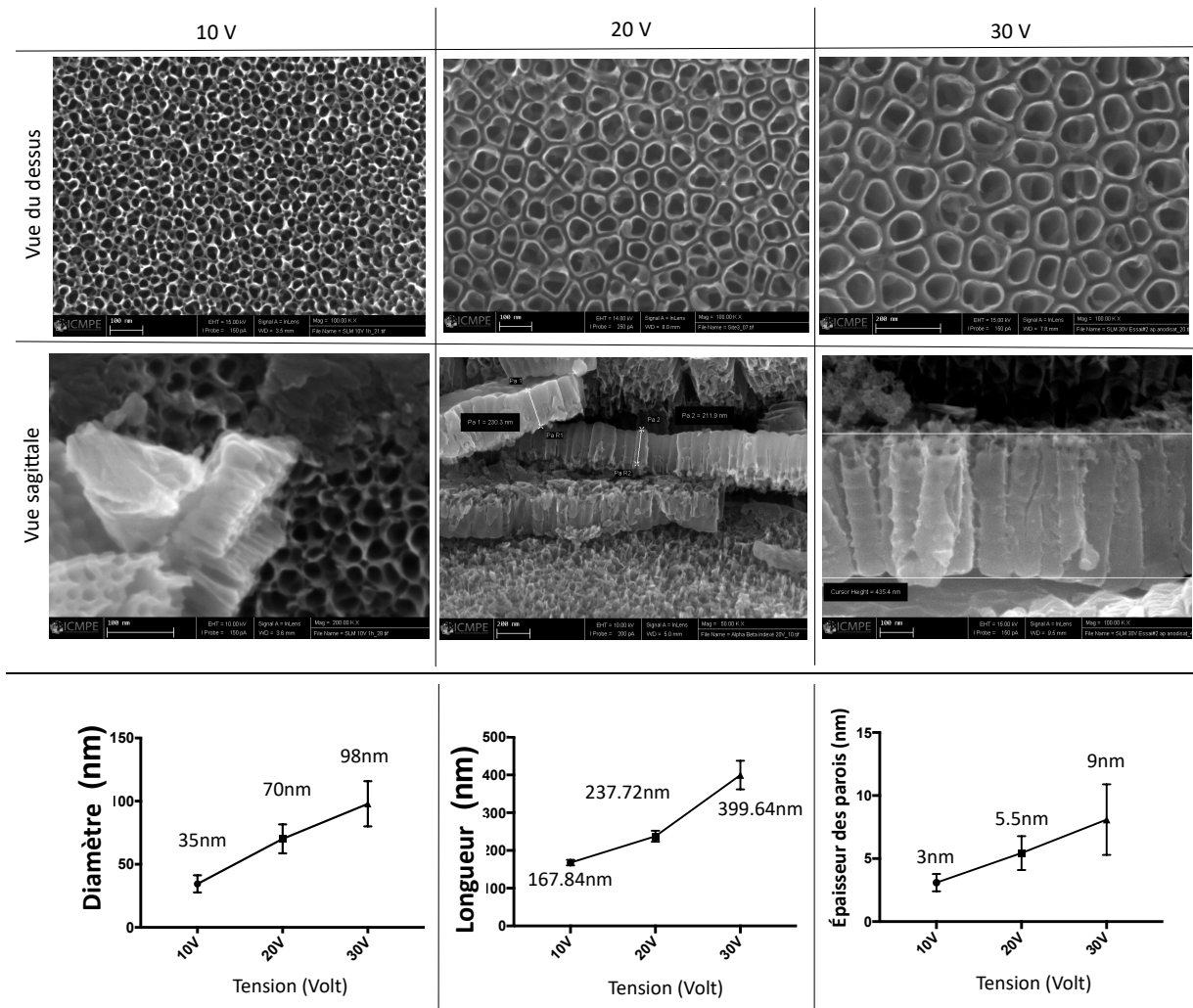


Figure 38 : Image de MEB et résultats de la mesure du diamètre, de la longueur et de l'épaisseur des parois en fonction des conditions d'anodisation.

Concernant les NT de TiO_2 formés sur l'échantillon contrôle, il apparaît que la moyenne des diamètres des NT est statistiquement différente sur l'échantillon obtenu par usinage que sur l'échantillon obtenu par SLM pour des conditions d'anodisation identiques. Les NT présents à la surface de l'échantillon usiné sont plus « larges » que ceux observés sur l'échantillon SLM. Cette différence était aussi significative en ce qui concerne la circularité des NT : l'échantillon SLM présentait des NT moins « réguliers » que ceux obtenus sur l'échantillon Contrôle (0.885 ± 0.056 vs 0.909 ± 0.037).

Cette différence, bien que minime, peut être liée au vieillissement de l'électrolyte. En effet, l'échantillon Contrôle a été traité en dernier et l'électrolyte a été utilisé en parallèle pour la caractérisation chimique. Comme il a été discuté dans l'article relatif à ce chapitre, le vieillissement de l'électrolyte peut améliorer les phénomènes électrochimiques intervenant entre la surface du substrat et l'électrolyte. En effet, le pH augmente, la conductivité baisse et le rapport des espèces ioniques Ti/F est plus favorable pour garantir un réseau de NT plus uniforme et plus régulier dans un électrolyte « âgé » (85).

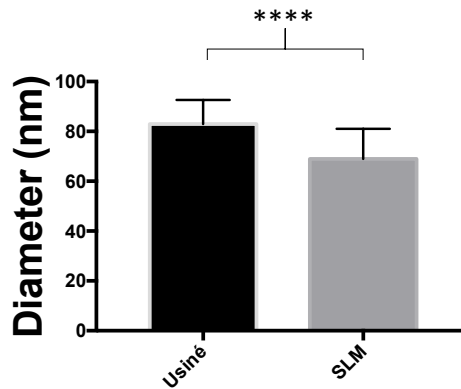


Figure 39 : Diagramme représentant le diamètre des NT sur un échantillon de Ti6Al4V usiné et sur un échantillon de Ti6Al4V obtenu par SLM avec $n=120$ mesures pour chaque échantillon anodisé à 20V pendant 1 h. **** $p<0.0001$.

- Influence de l'orientation cristallographique sur la morphologie des NT

La surface d'un matériau correspond à la création d'une zone où il y a eu une rupture de symétrie par rapport au volume du solide. En fonction de l'orientation de la face cristallographique, les atomes constituant la maille élémentaire ont perdu des voisins en surface par rapport au volume du solide. Ces atomes ou ions de surface sont susceptibles d'influencer les transferts d'électrons entre la surface métallique et l'électrolyte, c'est-à-dire le passage du courant pendant l'oxydation anodique. Cette différence pourrait modifier la création de la couche d'oxyde sur laquelle se forme le réseau de nanotubes et donc pourrait influencer la morphologie des nanotubes et la régularité de ces derniers.

Pour rappels, les alliages de titane peuvent exister selon deux réseaux cristallins: un réseau hexagonal compact pour la phase α de paramètre de maille $a_\alpha=0.295$ nm et $c_\alpha=0.468$ nm (avec un rapport $\frac{c_\alpha}{a_\alpha}=1.587$) stable jusqu'à la température de transformation α/β et un réseau cubique centré appelé phase β de paramètre $a_\beta=0.332$ nm stable jusqu'à la température de fusion. Comme il a été montré dans la partie précédente que les nanotubes ne croissaient pas sur la phase β , il a donc été décidé de ne se consacrer qu'à l'étude des nanotubes visibles sur la phase α hexagonale compacte (HC), et à un lien éventuel avec les types de plans cristallins. Le réseau HC comporte 3 types de plans : le plan basal (0001), les plans prismatiques orientés selon l'axe vertical de la maille HC (par exemple (01 $\bar{1}$ 0)), les plans pyramidaux de premier et de deuxième ordre inclinés à la fois par rapport au plan horizontal et à l'axe vertical (Figure 40).

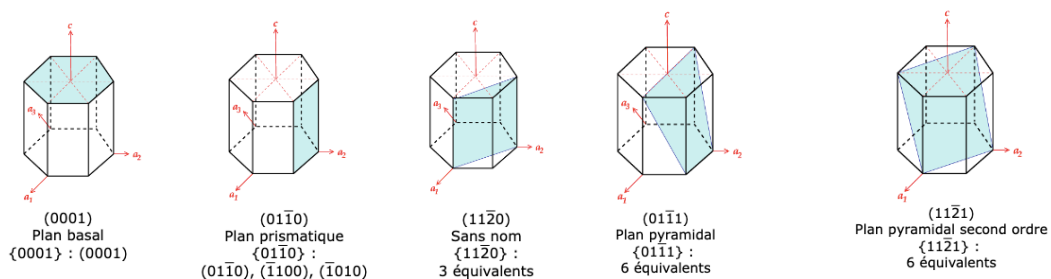


Figure 40 : Différents types de plans cristallins sur une structure HC.

A titre d'illustration, les dispositions de la maille HC par rapport à la surface d'analyse correspondant aux codes couleur (rouge, bleu, vert) orientés (0001) = basal, $(01\bar{1}0)$ = prismatique et $(\bar{1}2\bar{1}0)$ = pyramidal, sont reportées en figure 41, au même titre que l'aspect des NT formés sur ces différents types de plans cristallins.

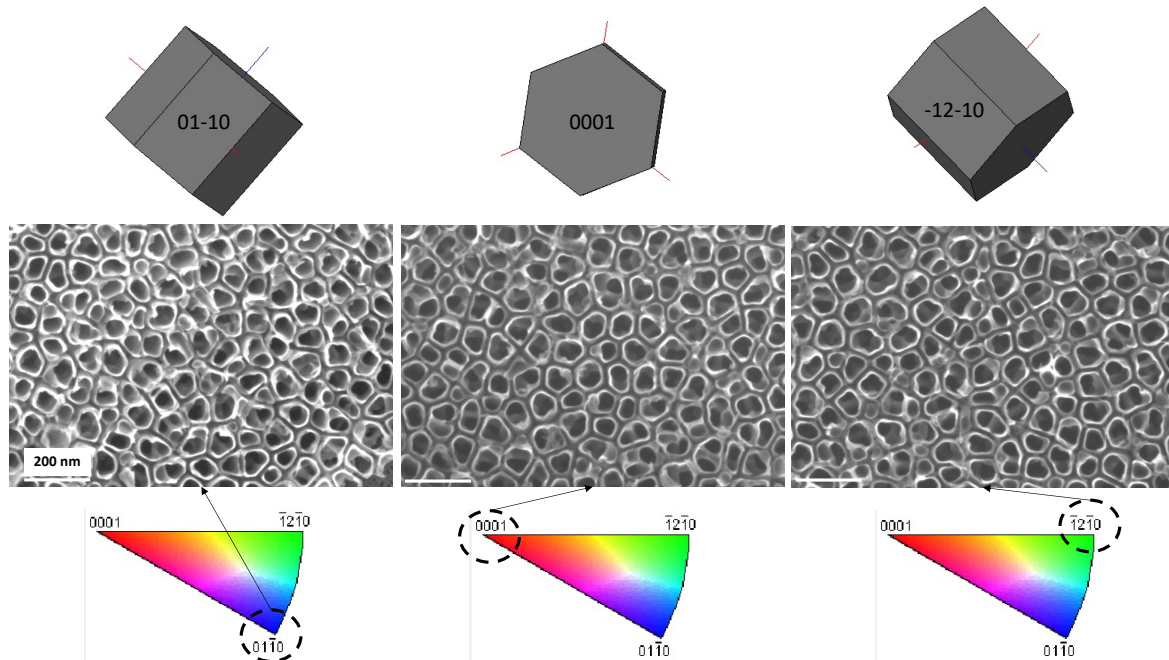


Figure 41 : Image de MEB et orientation cristallographique locale pour l'échantillon SLM 20V (code couleur en dessous).

Après analyse par Image J, les dimensions des NT formés par anodisation électrochimique ont été corrélées avec les orientations cristallographiques (Figure 42). Il est possible de conclure qu'il n'y a pas d'influence significative de l'orientation cristallographique sur la morphologie et la taille des NT pour des tensions d'anodisation égale à 20 V ou 30 V. En revanche, pour une tension d'anodisation égale à 10 V, le diamètre des NT est significativement plus petit sur les plan basaux (0001) que sur les autres plans. En d'autres termes, sur la phase HC d'échantillons de Ti6Al4V obtenus par SLM, les NT croissent de façon homogène et régulière, quelle que soit l'orientation cristallographique du grain ou de la latte HC si la tension d'anodisation est supérieure à 20 V.

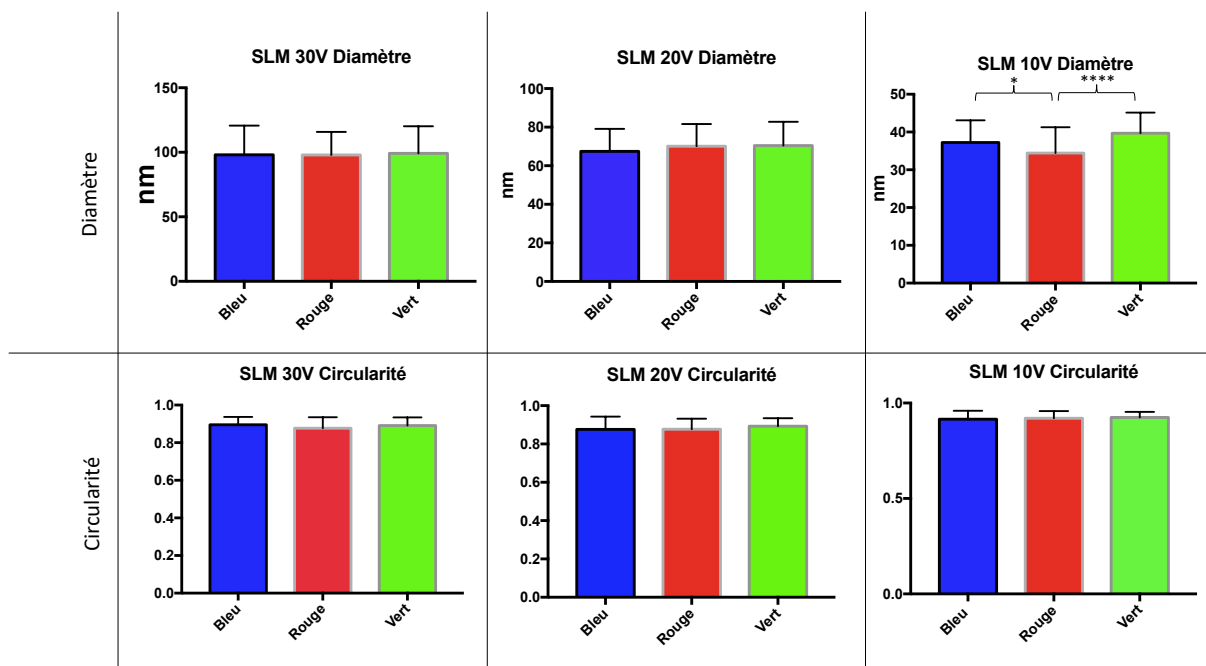


Figure 42 : Moyenne ($\pm$ écart type) des données concernant le diamètre et la circularité. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes familles de plans cristallins à l'exception du diamètre sur l'échantillon 10V. * $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

Cette différence de diamètre entre les plans cristallographiques basaux et les autres pour une tension d'anodisation égale à 10V peut être expliquée par le lien direct qui existe entre la réactivité des surfaces et la densité atomique. En effet, sur la phase HC, cette densité atomique est plus importante sur un plan basal (rouge) que sur un plan prismatique (bleu) ou un plan pyramidal (vert). Plus la densité atomique est grande et plus l'énergie de surface est réduite (86). Donc, le plan basal qui est le plus dense présentera l'énergie de surface la plus faible. Il serait censé être plus stable et donc moins réactif. En revanche, au-delà d'un certain potentiel, il est possible que cette différence de réactivité entre grains s'amoindrisse et masque ainsi les effets cristallographiques éventuels.

D'autres auteurs ont avancé l'hypothèse que sur les plans basaux, la formation d'une fine couche d'oxyde à l'interface métal-électrolyte préalable à la formation des NT est dépendante de l'orientation cristallographique du grain sous-jacent (87,88). Ils rapportent que sur les plans basaux, cette couche est plus dense que sur autres plans et que par conséquent les ions fluor contenus dans l'électrolyte ont du mal à traverser cette barrière, cela ayant pour conséquence la non-formation de NT sur ces plans.

Il est aussi possible d'avancer une dernière hypothèse plus simple : pour une faible tension d'anodisation, le réseau de NT formés est moins régulier. Les dimensions calculées à partir d'image de MEB sont par conséquent plus difficiles à mesurer, surtout à cette toute petite échelle. Il n'est pas possible d'exclure l'hypothèse que la différence retrouvée est la cause du protocole expérimental.

III-3-1-4 Synthèse

L'anodisation appliquée à des surfaces en Ti6Al4V obtenues par SLM puis polies mécaniquement est possible de la même façon que sur du Ti6Al4V obtenu par usinage. Visuellement, cela se traduit par la création de NT homogènes sur la phase alpha et la présence de régions creuses sur la phase bêta. Puisqu'il a été estimé que la phase bêta ne correspond qu'à 2% de la surface totale, il est difficile de savoir si ces régions creuses non revêtues de NT auraient un impact clinique sur la réponse des cellules gingivales.

L'une des hypothèses formulées (une différence de réactivité lors de l'anodisation en fonction de l'orientation cristallographique du polycristal de Ti6Al4V, donc de l'énergie de surface) n'a été vérifiée lors de ces essais que pour une tension d'anodisation faible de l'ordre de 10V.

Si pour des raisons expérimentales ce protocole a d'abord été appliqué sur des surfaces de Ti6Al4V préalablement polies, la croissance de NT sur une surface de Ti6Al4V brute est dépendante des mêmes conditions énoncées en termes de composition chimique ou de cristallographie. La surface ainsi créée présente alors une double rugosité (la micro-rugosité de surface inhérente au procédé et la nano-rugosité consécutive à l'anodisation) qui pourra à l'avenir faire l'objet d'investigations supplémentaires pour une application biologique.

Grâce à ces observations, il est possible d'imaginer un protocole consistant à modifier par anodisation les surfaces transgingivales des PPIP obtenues par SLM, qu'elles soient brutes, reprises par usinage ou polies, avec de préférence une tension d'anodisation supérieure à 20V pour garantir l'homogénéité des surfaces obtenues.

Une dernière partie sera consacrée à l'étude de la chimie d'une surface de Ti6AL4V anodisée et sa capacité à adsorber un bio-polymère.

III-3-2 Caractérisation de la chimie de surface des échantillons anodisés

La réactivité des surfaces nanostructurées va être fondamentale dans les processus d'adsorption puisque c'est cette zone de la surface du matériau implanté qui va directement interagir avec le milieu biologique environnant. Cette activité particulière repose bien entendu sur la topologie à l'échelle nanométrique de celle-ci mais aussi sur la composition « chimique » de la surface.

III-3-2-1 Protocole expérimental

Les échantillons ont été mis en forme avec les mêmes paramétrages que pour la caractérisation morphologique, puis neuf échantillons ont suivi une gamme de polissage jusqu'à 2400 (n=9) (Tableau 4). Deux échantillons contrôles obtenus par usinage ont été traité de façon similaire (n=2).

Tableau 5 : Gamme de polissage subis par les échantillons pour la caractérisation de chimie de surface.

Abrasif	Force de pression centrale (N)	Vitesse de rotation de la roue de travail (tour/min)	Vitesse de rotation de la tête de polissage (tour/min)	Type de rotation de la roue de travail par rapport à la tête de polissage	Vitesse d'écoulement	Temps
320	15	300	150	Horaire	NC	Jusqu'à planéité
1200	15	300	150	Horaire	NC	45s
2400	15	150	150	Horaire	NC	45s

La composition chimique des surfaces a été déterminée grâce à la spectroscopie de photoémission (XPS). Cette technique permet d'avoir une information élémentaire (% atomiques des différents éléments présents dans les premiers nanomètres du matériau) et sur les liaisons chimiques dans lesquelles les éléments détectés sont impliqués. Il existe de nombreux ouvrages concernant cette technique, aussi seules les grandes lignes de cette spectroscopie sont présentées ici.

Le principe fondamental de la spectroscopie de photoélectrons X, appelée XPS, repose sur l'irradiation de la surface d'un solide par un rayonnement X monochromatique d'énergie $h\nu_0$. L'interaction rayonnement-matière qui a alors lieu concerne majoritairement la photoabsorption. Les photons incidents pénètrent dans le matériau sur une profondeur de l'ordre du micromètre et sont absorbés par interaction avec les électrons de cœur et/ou de valence présents dans le solide, ou des molécules adsorbées sur la surface. L'absorption d'un photon d'énergie $h\nu_0$ par un électron localisé sur une orbitale atomique d'énergie E_1 , provoque l'éjection de cet électron dans le continuum à la condition que $h\nu_0 > E_1$. Ce phénomène abouti donc à la « disparition » du photon et à la création d'un photoélectron (électron qui est éjecté) dont l'énergie cinétique E_{C1} est égale $h\nu_0 - E_1$. Le spectromètre d'électron (dans ce travail un Kalpha de la marque ThermoElectron équipé d'une source $AlK\alpha$ d'énergie 1486.4 eV) détecte et enregistre l'énergie cinétique des photoélectrons qui sortent du solide suite à l'irradiation par la source X. La relation entre énergie cinétique mesurée et énergie de liaison de l'électron éjecté permet d'identifier chaque élément émetteur, puisque pour chaque élément de la classification périodique, il existe un ensemble de niveaux atomiques dont l'énergie est quantifiée. Pour un élément donné, il apparaîtra donc sur un spectre de photoémission, des raies caractéristiques (pics) localisées à des énergies de liaison spécifiques E_i , tant que $h\nu_0 > E_i$. C'est le principe de caractérisation élémentaire (composition des éléments de surface du matériau).

Comme mentionné plus haut, la photoémission procure une information sur la liaison chimique. En effet, lorsqu'un atome est impliqué dans une liaison chimique, un transfert d'électrons plus ou moins important s'opère avec les atomes auxquels il est lié et cela va modifier l'énergie de liaison de tous les niveaux E_i de cet atome. Plus le transfert électronique est important et plus le déplacement sera grand. Par exemple, le niveau 1s du carbone (pic C_{1s}) peut apparaître sur un spectre XPS vers 285 eV ce qui correspond à l'énergie de liaison du niveau 1s pour des atomes de carbone impliqués dans des liaisons C-H. Pour des carbones plus oxydés (C-OH, COOH), l'énergie de liaison du niveau 1s apparaît respectivement vers 286 et 288 eV. Dans le cas d'un élément métallique, si celui-ci est impliqué dans une liaison oxygène-métal (état oxydé), alors l'énergie de liaison des niveaux atomiques du métal sera située à un plus haut

niveau. Cette observation, comme pour le carbone, provient du fait que l'oxygène étant plus électronégatif, attire les électrons et provoque ainsi une charge locale positive sur ses voisins, ce qui est ressenti par le photoélectron émis qui de ce fait, est plus difficilement extrait de l'atome émetteur (donc énergie de liaison plus forte).

Les photoélectrons, tels qu'ils viennent d'être décrits, sont créés sur toute la profondeur de pénétration du rayonnement X, c'est à dire de l'ordre du micron. Or ceux qui sont détectés par l'analyseur ne proviennent eux que des premiers nanomètres de la surface du matériau. C'est pour cette raison que la photoémission est **une technique d'analyse de surface**.

Ce phénomène vient du fait que la section efficace d'interaction (probabilité d'interaction) est beaucoup plus grande pour les interactions électron-matière que photon-matière. Seuls les électrons qui auront été créés proche de la surface auront une chance de sortir du matériau et d'être détectés par l'analyseur. Les autres, créés trop profondément sous la surface, perdront toute leur énergie par collisions successives (chocs élastiques et inélastiques) avant de l'atteindre.

Ensuite, afin d'étudier l'aptitude des surfaces créées à accrocher un bio-polymère, une analyse par infrarouge de surface (IRRAS).

La technique de spectroscopie infrarouge est très complémentaire de la photoémission pour ce type de dessin. Elle permet de caractériser les modes de vibration de molécules présentes sur la surface et de vérifier si certaines fonctions organiques sont modifiées par adsorption sur certains sites de la surface. Cela s'opère par l'identification de certains modes de vibration spécifiques de certains groupements moléculaires (comme CH₂, CH₃, NH₂, COH, COOH) et l'observation spectrale d'un déplacement de la fréquence de ces modes de vibration lorsqu'ils sont perturbés par leur environnement chimique.

L'appareil utilisé dans cette étude est un spectromètre à transformée de Fourier de la marque ThermoElectron équipé d'une platine de réflexion-absorption VEEMAX. Concernant les études d'adsorption d'une biomolécule sur les surfaces anodisées, il a été décidé d'adsorber de la gélatine, qui est en réalité du collagène dénaturé et hydrolysé. La gélatine utilisée dans cette expérience a été extraite à partir d'un tissu osseux bovin (Lot #SLCJ2223, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Cette protéine, de structure simple, va permettre de caractériser l'aptitude des surfaces de Ti6Al4V anodisées à interagir avec un composant biologique mais aussi de fonctionnaliser la surface pour augmenter sa reconnaissance par les cellules qui peuvent potentiellement la coloniser (le collagène est un composant majeur de la matrice extra cellulaire).

Concernant les interactions des surfaces avec des molécules, 6 échantillons (n=6) anodisés à différents voltage (10 V – 20 V -30 V) ont été trempés dans un bain de gélatine à 0.1g.L⁻¹ de pH=8.3 ou pH=5, à différents temps pour suivre l'évolution de l'adsorption. Après un temps d'interaction maximum de 40 minutes, les disques ont été retiré, puis rincer avec un jet d'eau distillée et passés aux ultra-sons pendant 5 minutes. Entre chaque temps d'exposition ou chaque étape, une mesure à l'IR a été réalisée.

III-3-2-2 Résultats de l'analyse XPS & discussion

La composition chimique élémentaire de la surface des trois échantillons anodisés (10V, 20V et 30V) a été déterminée par XPS ($n=3$). Pour voir l'influence du pH sur la nature des sites présents à la surface de TiO_2 , les échantillons ont d'abord été immergés post anodisation dans une solution d'eau désionisée dont le pH a été ajusté à 3. Ensuite, les mêmes échantillons ont été à nouveau préparés par polissage mécanique (tableau 5) puis immergés dans une solution d'eau désionisée dont le pH a été ajusté cette fois-ci à 7. L'opération a été répétée pour une solution avec un pH fixé à 11. La figure 43 présente le spectre XPS global (*survey*) de l'échantillon anodisé 10V trempé dans une solution acide de pH=3.

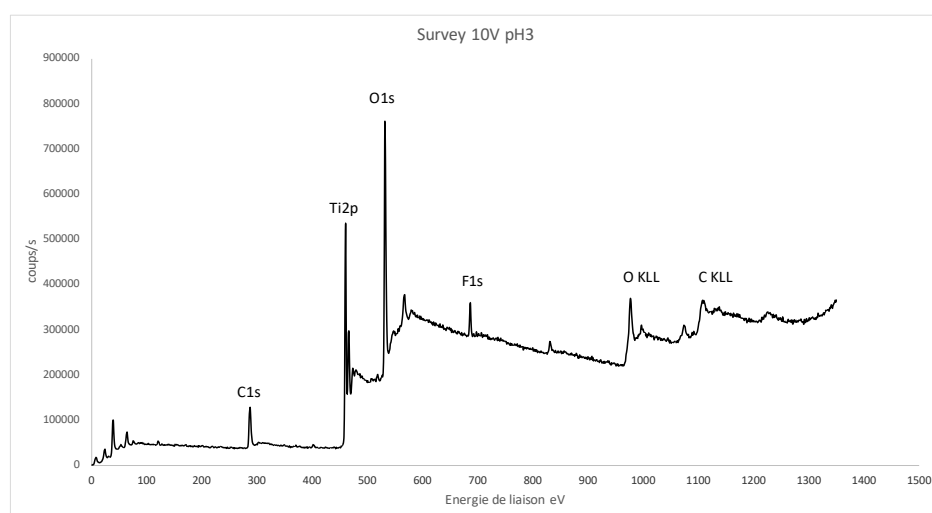


Figure 43 : Spectre XPS concernant toute la gamme des énergies de liaisons accessibles à partir de la source monochromatée $\text{MgK}\alpha$. Ce spectre à grande énergie de passage (200eV) est de faible résolution énergétique et montre la présence de pics caractéristiques des principaux éléments présents à la surface de l'échantillon.

Les principaux pics de photoélectrons qui apparaissent sur ce spectre correspondent au titane (niveau 2p), à l'oxygène (niveau 1s), au carbone (niveau 1s) et au fluor (niveau 1s). A plus haute énergie de liaison, apparaissent les raies Auger caractéristiques du carbone (C KLL) et de l'oxygène (O KLL). Ce spectre général est à basse résolution et ne sert qu'à déterminer la composition élémentaire de la surface. Pour avoir une information sur les liaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont impliqués, une acquisition sur une fenêtre en énergie plus restreinte est réalisée (l'énergie de passage des photoélectrons dans l'analyseur est alors de 20 eV). La figure 44 représente ces spectres haute résolution pour les différents éléments détectés sur le *survey*.

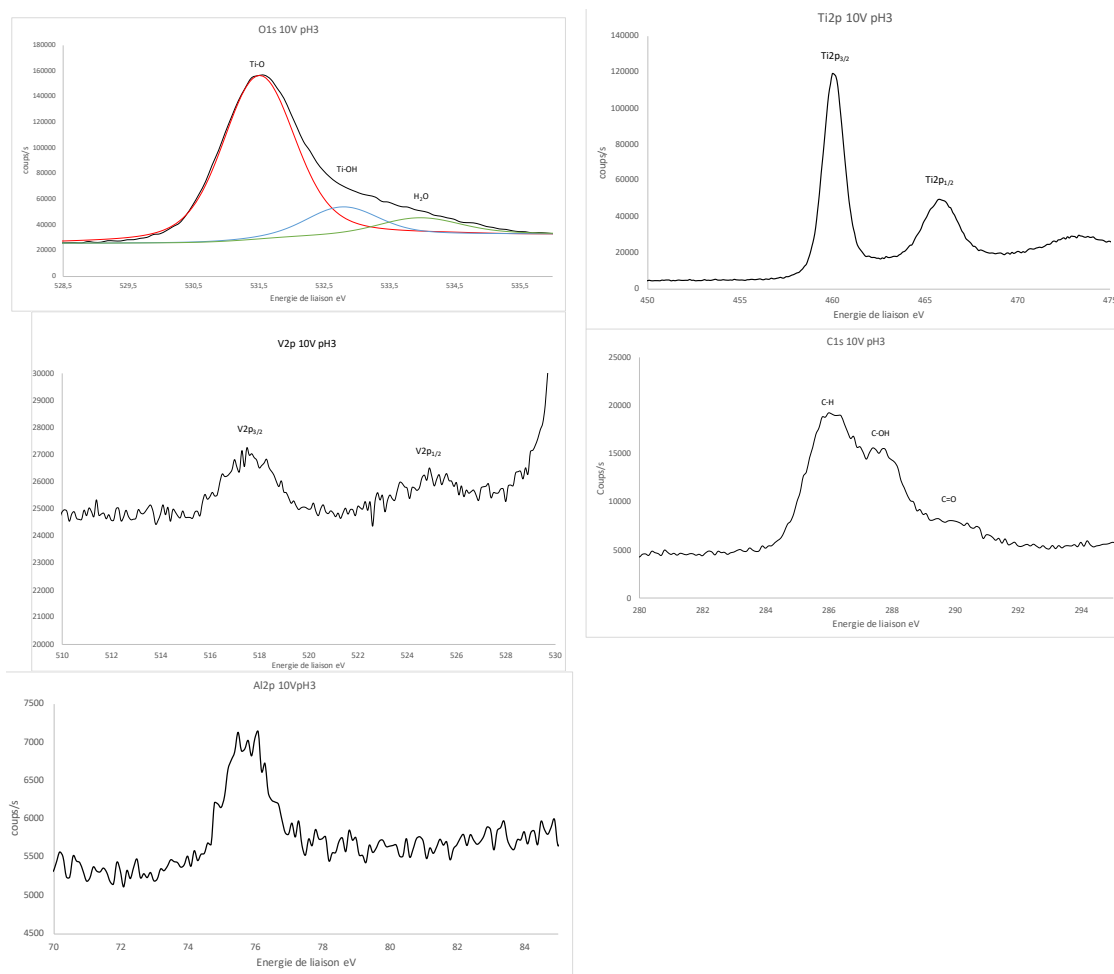


Figure 44 : Spectres haute résolution pour les différents éléments retrouvés à l'XPS.

Le niveau 2p du titane présente 2 pics caractéristiques du dédoublement spin-orbite avec une composante $2p_{3/2}$ située vers 460 eV et une composante $2p_{1/2}$ de plus faible intensité située vers 466 eV. L'énergie de liaison de ces 2 pics correspond à celle de l'oxyde de titane TiO_2 , déplacée en énergie de +1.0 eV. Ce déplacement en énergie est relevé, comme nous allons le voir sur l'ensemble des pics du spectre de photoémission. Concernant le pic O_{1s} de l'oxygène, il est en fait constitué de 3 composantes. La principale est située à 531.5 eV et est attribuable aux ions oxygène du réseau TiO_2 des nanotubes. La seconde, localisée vers 532.7 eV correspond aux hydroxyles de surface et la troisième située vers 534 eV serait attribuable aux atomes d'oxygène de molécules d'eau présentes à la surface des nanotubes.

L'acquisition de fenêtres à haute résolution fait apparaître clairement des pics de faible intensité qui correspondent au niveau 2p du vanadium (518, 525 eV) de V_2O_5 et de l'aluminium (76 eV) sous forme de Al_2O_3 . Cela montre clairement qu'il existe de faible quantité d'oxyde d'aluminium et de vanadium dans les nanostructures. Toutefois, par rapport à la composition nominale de l'alliage de départ (Ti6Al4V), l'oxyde de vanadium et l'oxyde d'aluminium sont sous-exprimés, donc Al et V s'oxydent moins que Ti dans nos conditions d'élaboration.

Le pic C_{1s} du carbone fait quant à lui, clairement apparaître 3 composantes (286, 287.5, 289.7 eV) qui correspondent respectivement à C-H, C-OH et COOH. Ceci n'est pas surprenant puisque de l'acide acétique (ou acide éthanóïque) se figure dans la composition du bain d'anodisation. La même remarque peut être faite concernant la présence des ions fluorure

révélée par le pic F1s (vers 700 eV). Les différents pourcentages élémentaires donnés par le logiciel Advantage du spectromètre sont présentés dans le tableau 6A. Le tableau 6B indique quant à lui le % des composantes des pics O_{1s} et C_{1s}.

Tableaux 6 : A) Pourcentage des différents éléments. B) Pourcentage des pics O_{1s} et C_{1s}.

A)	Éléments	%	B)	O	%
	Ti	16.9		O1	78
	O	48.4		O2	14
	C	27.6		O3	8
	F	4.2		C	%
	V	0.1		C1	52
	Al	1.5		C2	36
	Na	1.1		C3	12
	Cl	0.2			

L'analyse des pourcentages correspondant à la structure chimique des nanotubes, hors eau et hydroxyles adsorbés, montre que le pourcentage élémentaire d'anions oxygène correspond à 78% des 48% totaux de O²⁻, ce qui donne 37.4 % d'anions oxygène dans la structure des nanotubes.

Ce pourcentage doit être associé à l'oxyde de titane TiO₂ de l'oxyde d'aluminium Al₂O₃ et de l'oxyde de vanadium détecté par les cations Ti⁴⁺, Al³⁺ et V⁵⁺ donc $16.9 \times 2 + 1.5 \times 3/2 + 0.1 \times 5/2 = 36.3\%$. Il existe donc un accord à 1% près entre les pourcentages anioniques et cationiques des oxydes qui composent nos nanotubes. Même si ce faible écart est dans la marge d'erreur des mesures expérimentales réalisées, un tel écart pourrait correspondre à une sous-stœchiométrie cationique des nanostructures qui ne doivent pas être exemptes de défauts de structure.

La décomposition du pic O_{1s} montre qu'il y a un taux important d'hydroxylation et d'hydratation de la surface des nanotubes. 14% de la surface est constituée d'OH adsorbés et 8% d'eau moléculairement adsorbée. Les analyses XPS se font sous vide (de l'ordre de 10⁻¹⁴ atm). L'eau simplement physisorbée désorbe lors du pompage et il ne reste alors que les entités moléculaires liées fortement à la surface. Il est également possible de remarquer que d'après le pic C_{1s}, une quantité importante d'ion acétate (de l'ordre de 27%) est adsorbée à la surface. Cela n'est pas surprenant car les carboxylates s'adsorbent facilement sur les surfaces d'oxyde en formant des liaisons de type hydrogène ou des liaisons électrostatiques avec les cations de surface.

Cette même analyse élémentaire a été réalisée sur les 3 types d'anodisation à 3 pH différents. Les résultats sont donnés dans le tableau 7 suivant.

Tableau 7 : Pourcentage des différents éléments à différents pH (acide, neutre et basique) mesurés à l'XPS.

		Élément	10V	20V	30V
pH3		Ti	16.9	20.9	20.8
		O	48.4	52.6	53.8
		C	27.6	17.4	15.2
		F	4.2	5.1	5.4
		V	0.1	0.0	0.1
		Al	1.5	3.1	2.9

	Na	1.1	0.8	1.3
	Cl	0.2	0,1	0.3
pH7	Ti	15.7	17,1	16.5
	O	48.8	54,1	49.4
	C	26.2	20.0	24.5
	F	5.4	5,3	5.5
	V	0.1	0.1	0.0
	Al	2.5	2.3	3.0
	Na	1,2	0.8	1.0
	Cl	0.2	0,1	0.1
pH11	Ti	16,4	19,2	15,4
	O	48.2	47,2	48.8
	C	22.0	21.2	22,8
	F	4,7	5,7	3,9
	V	0.1	0,1	0.1
	Al	2.3	2.7	2.4
	Na	3.0	3.5	2.4
	Cl	0.2	0,2	0.2

Il apparaît que la composition chimique de la surface ne varie pas de manière significative avec le pH de la solution dans laquelle les échantillons ont été immergés.

Le tableau 8 indique la décomposition du pic O_{1s} pour les différents pH et tensions d'anodisation. La décomposition du pic de l'oxygène permet de confirmer une composition en hydroxyles et en eau adsorbée qui semble dépendre assez peu du pH de la solution et du diamètre des tubes.

Tableau 8 : Décomposition du pic d'oxygène.

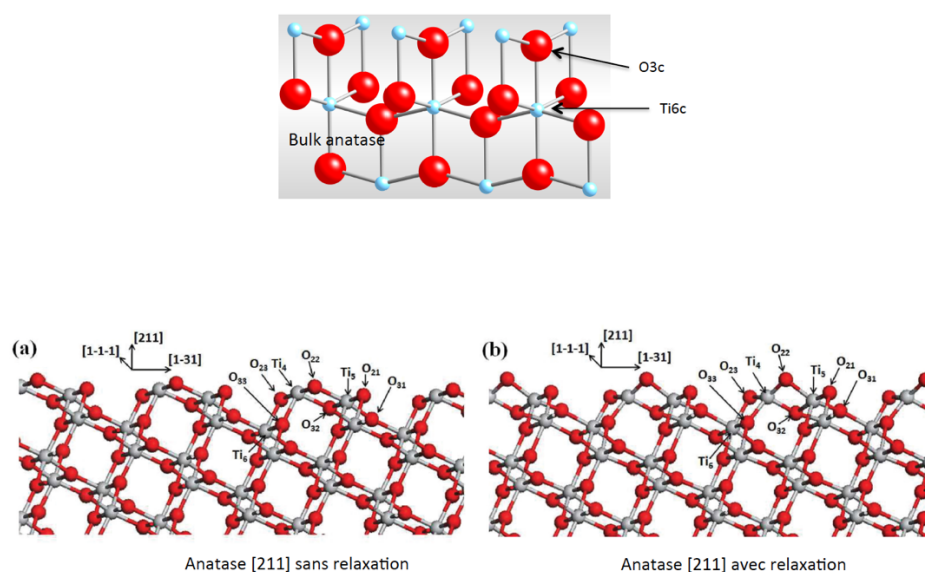
	O_{1s}	10V	20V	30V
pH3	O1	78%	83%	75%
	O2	14%	11%	15%
	O3	8%	6%	10%
pH7	O1	69%	76%	73%
	O2	24%	16%	15%
	O3	7%	8%	12%
pH11	O1	79%	78%	67%
	O2	13%	14%	23%
	O3	6%	8%	10%

Pour expliquer les résultats obtenus par photoémission il faut rappeler les concepts qui permettent d'expliquer la composition chimique de surface d'un oxyde, d'une manière la plus simple possible.

Comme il a été signalé dans la partie concernant la caractérisation morphologique, la surface d'un matériau correspond à la création d'une zone où il y a eu une rupture de symétrie par rapport au volume du solide. Les atomes situés dans le plan de surface ont perdu des voisins et se retrouvent donc avec un manque de liaisons chimiques par rapport à ceux qui se trouvent enfouis dans le solide. Ces atomes se trouvent, lors de la « création » de la surface, dans un état

de non-équilibre avec un excès d'énergie qui est à relier avec l'énergie de surface (notion de tension superficielle). Les atomes ou ions de surface sont donc dans un état instable lorsque la surface est créée et ils vont naturellement chercher à réagir en créant de nouvelles liaisons chimiques, soit avec leur voisins dans le plan de surface, soit avec des molécules ou atomes du milieu extérieur, qu'il soit liquide ou gazeux. C'est ce qu'on appelle **l'adsorption**.

Ce réarrangement des ions à la surface du solide va dépendre de la structure (au sens structure cristalline) de l'oxyde (pour TiO_2 , anatase, rutile par exemple) et de l'orientation du plan de coupe du solide. Concernant les phases anatase ou rutile, les atomes de titane possèdent 6 premiers voisins oxygène, alors que les oxygènes, eux possèdent 3 premiers voisins titane au cœur du solide, comme le montre la figure 45 ci-dessous.



Anatase [211] from J. Xu DOI 10.5772/intechopen.69141

Figure 45 : Les atomes de titane sont indiqués en gris et les atomes d'oxygène sont en rouge indiqués ; d'après Xu et al. 2017 (89).

Certaines surfaces, comme la surface [211] présentée dans le bas de la figure 45, montrent des oxygènes avec 2 voisins (O_{2c}) et non 3 (O_{3c}) et des titanes avec 5 voisins (Ti_{5c}) et 3 voisins (Ti_{3c}) et non 6 voisins (Ti_{6c}) comme dans l'intérieur du solide. Cet exemple montre clairement qu'à la surface d'un oxyde, certains ions sont en sous-coordination par rapport à leur situation de volume et sont donc des sites réactionnels spécifiques.

En ce qui concerne les surfaces anodisées dans ce travail, la couche d'oxyde obtenue est très probablement sous forme amorphe puisqu'il n'y a eu aucun post traitements thermiques secondaires pour cristalliser cette couche nanotubulaire de TiO_2 . Par conséquent, la très basse dimensionnalité (nanostructures) peut amener à présenter une plus grande diversité de ces sites non parfaitement coordonnés pour les atomes de titane et d'oxygène, ce qui conduit à différents types de sites réactifs.

En ce qui concerne la partie liquide dans le cas d'une interface solide-liquide, il faut tenir compte, non seulement de l'eau, mais aussi de la présence d'anions et/ou de cations présents dans la solution (Na^+ et Cl^- par exemple dans le cas d'une solution de chlorure de sodium ou de protéine ionisée en solution aqueuse). Si la surface, après protonation et hydroxylation par dissociation de l'eau est chargée positivement, alors une première couche d'ions de signe

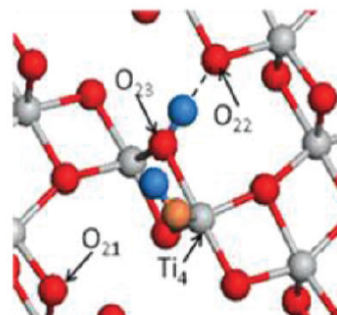
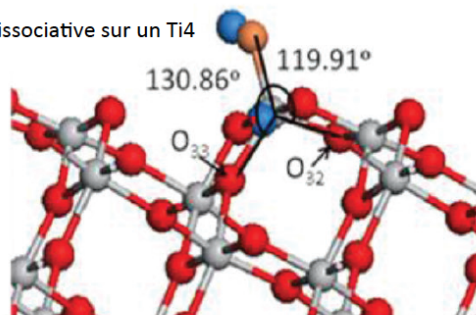
opposé (Cl^-) viendra au plus proche de la surface pour compenser localement l'excès de charge de la surface. Cet ordonnancement ionique proche de la surface s'effectue concomitamment avec une structuration de l'eau sur quelque dixième de nanomètres. En XPS, les ions Na^+ , Cl^- ou F^- observés résultent de ces phénomènes d'équilibre et compensation de charge proche de la surface. Ces différents ions détectés sont piégés sur la surface lors de la disparition du film d'eau liquide lors du séchage et du passage sous vide pour analyse.

Pour expliquer la présence d'hydroxyles (OH adsorbés) ou d'eau adsorbée moléculairement sur la surface, il faut introduire le concept de complexe de sphère interne et de complexe de sphère externe. Le premier cas correspond à une interaction forte avec la surface et le second cas à une interaction faible. Le premier type d'interaction fait apparaître de nouvelles liaisons « chimiques » avec la surface et ce phénomène est appelé **chimisorption**. Le second repose sur des forces beaucoup plus faibles de type Van der Waals ou des liaisons de type hydrogène et il s'agit alors de la **physisorption** (86).

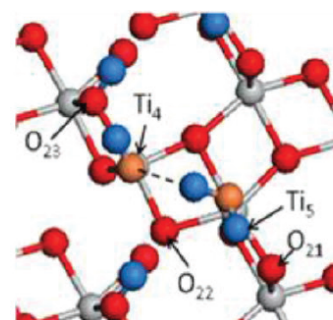
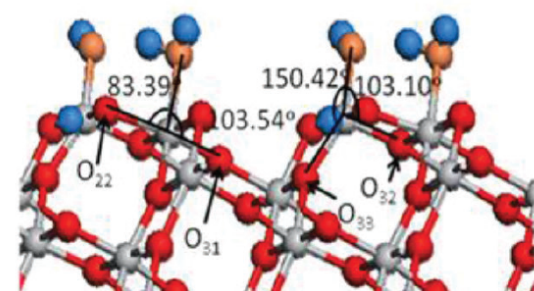
La chimisorption, impliquant la formation de liaisons chimiques molécule-surface, se produit donc par échange électronique entre des atomes de l'adsorbat et du substrat. Ce type de liaisons est donc bien entendu de courte portée (quelques angströms) et sélectives quant au site d'adsorption. La physisorption peut être due quant à elle à des interactions interatomiques (de type liaison hydrogène), intermoléculaires (interaction de type Van der Waals) ou bien purement électrostatiques. Ces interactions « faibles » sont le plus souvent réversibles, alors que les liaisons fortes ne le sont pas.

Les surfaces étudiées, ainsi que les surfaces d'oxydes telles que décrites ci-dessus, ont été exposées à l'eau liquide (lors de la synthèse, de la mise en interaction et du rinçage) et à l'eau vapeur (stockage, transfert). Pour comprendre la réactivité de ces surfaces il faut donc considérer en premier lieu l'interaction de H_2O avec les surfaces. De nombreuses études ont été réalisées ces dernières décennies sur des surfaces d'oxydes parfaitement caractérisées (faces monocristallines d'orientation spécifique). Celles-ci mettent clairement en évidence que l'eau peut s'adsorber plus ou moins fortement et donner lieu à de l'eau faiblement liée (physisorbée), de l'eau liée par chimisorption sur un site de surface mais de manière moléculaire (eau non dissociée) ou bien interagir par chimisorption dissociative (donnant lieu à des hydroxyles et protons adsorbés). Ces différents cas dépendent principalement du type de sites présents à la surface et de leur défaut de coordination par rapport au volume, comme il a été expliqué précédemment. En poursuivant ce raisonnement sur la réactivité liée à la coordinance des sites de surface, la physisorption aura principalement lieu sur une surface de faible énergie superficielle avec des ions faiblement perturbés par rapport à leur environnement du *bulk*, tandis qu'une chimisorption dissociative aura lieu sur des sites présentant des cations et/ou anions de surface de faible coordinance (avec une perte importante de premiers voisins). La figure 46 ci-dessous issu du travail de Xu et al. 2017 (89) présente le cas d'une chimisorption moléculaire et dissociative de H_2O sur la face [211] de l'anatase sur, respectivement un site Ti_5 et Ti_4 .

Chimisorption dissociative sur un Ti4



Chimisorption dissociative sur un Ti4 et moléculaire sur un Ti5



Anatase [211] from J. Xu DOI 10.5772/intechopen.69141

Figure 46 : Les atomes de titane sont indiqués en gris et les atomes d'oxygène sont indiqués en rouge. Représentation d'une surface cristalline de TiO_2 avec des sites où l'eau est adsorbée moléculairement et d'autres où l'eau s'est dissociée en un OH^- (lié à un cation Ti) et un H^+ lié à un anion voisin ; d'après Xu et al. 2017 (88).

Cette interaction de l'eau avec la surface d'oxyde est fondamentale pour comprendre la réactivité d'une surface anodisée. En effet, eau moléculaire, hydroxyles et protons de surface peuvent être échangés lors de l'adsorption d'un ion ou d'une molécule sur la surface. L'eau dissociée en H^+ et OH^- de surface est la source d'une réactivité de type Brönsted au sens acide-base (échange de protons et/ou d'hydroxyles). Il a même été montré, par marquage isotopique, que l'eau moléculaire adsorbée (non dissociée et liée à un cation Ti^{4+} de la surface), participe aux échanges atomiques entre la surface et certaines espèces moléculaires.

Compte tenu de cette notion de surface protonée et/ou hydroxylée, il est naturel à présent d'introduire **l'influence du pH de la solution aqueuse et son influence sur la chimie de la surface d'oxyde étudiée**, puisque la charge de surface peut varier en fonction de la composition de la solution électrolytique dans laquelle la surface du solide est immergée lors de l'interaction. L'intérêt scientifique pour la caractérisation de la charge de surface des surfaces d'oxydes métalliques a commencé à la fin des années 50 et au début des années 60. Bolt en 1957 (90) a mesuré pour la première fois une charge variable de la surface de silice en fonction du pH de la solution avec laquelle le solide est en contact. Parks et De Bruyn en 1962 (91) l'ont fait pour celle des oxydes de fer en 1962, puis, plus tard Bérubé et De Bruyn en 1968 (92) pour l'oxyde de titane.

Ces surfaces d'oxydes sont amphotères au sens où elles peuvent être chargées négativement, positivement ou être neutres. Le caractère amphotère est à relier à la l'existence de sites qui ont des propriétés de base énoncées par Brönsted (aptitude à capter un proton) et de sites capables de céder des protons. La variation de charge de ces surfaces est donc liée au degré d'adsorption de protons, en fonction du pH en solution et/ou de la nature des ions présents en solution.

Dans certaines conditions, la surface va contenir autant de charges positives que négatives et sera donc neutre. Cette vision simple de l'existence de sites acides et de sites basiques décrit

par Brönsted à la surface d'un oxyde a amené les scientifiques à introduire la notion de PCN (ou PZC), point de charge nulle et de PIE, point isoélectrique. Le point de charge nulle (PCN) est une donnée physique fondamentale pour les surfaces d'oxydes car il reflète l'acido-basicité de la surface. Il est défini d'après Parks en 1965 (93) ou Morrison en 1980 (94), comme le pH du milieu pour lequel la charge nette de la surface est nulle. En reprenant les concepts d'adsorption de H₂O sur une surface d'oxyde, nous pouvons clarifier le concept de PZC à partir des schémas présentés dans la figure 47 ci-dessous :

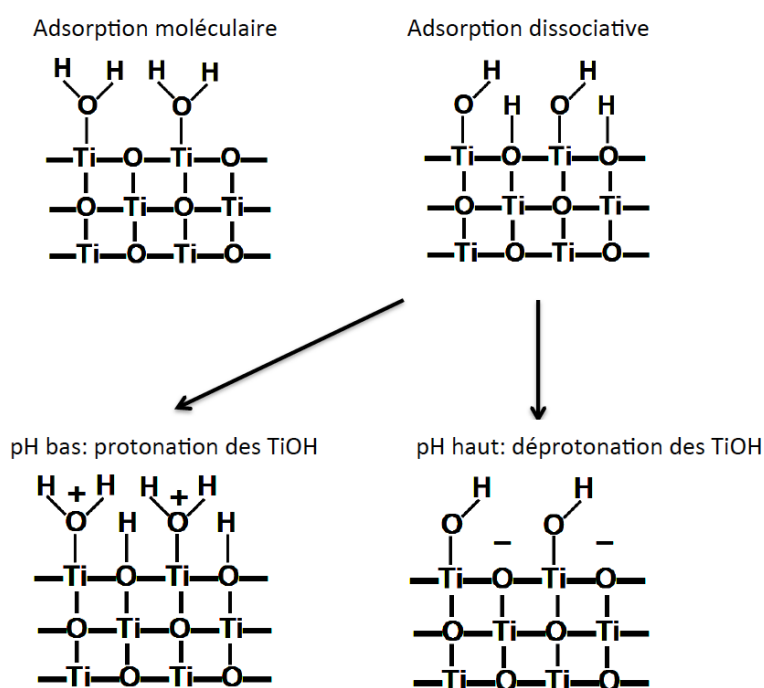


Figure 47: Coupe transversale perpendiculaire plan d'adsorption. Lors d'un pH bas (acide), H₂O reste sous sa forme moléculaire avec OH protoné alors qu'en cas de pH haut (basique) il y a une perte de H⁺ dans la solution laissant place à un O⁻.

Lorsque le pH de la solution est égal au PZC, alors il y a autant de protonations que de déprotonations et nous avons alors la charge de protonation globale de la surface QH qui est nulle :

$$[\text{Ti}-\text{OH}_2^+]_s = [\text{Ti}-\text{O}^-]_s$$

La charge globale de surface QH peut donc être positive (pH < PZC), négative (pH > PZC) ou nulle lorsque pH = PZC. De nombreuses études ont là encore été réalisées sur le PZC de différents types d'oxydes.

En reliant ces concepts avec ceux de structure des sites de surface, il est logique de déduire que le PZC va dépendre de la nature des sites de la surface d'oxyde (coordinance) et donc de l'orientation de la face cristallographique. De la même manière, le PZC va dépendre aussi de la présence de défauts (lacunes, marches). **En ce qui concerne l'oxyde de titane TiO₂, le PZC se situe aux environs de 6 (95).**

Le concept de point isoélectrique (PIE) fait quant à lui intervenir d'autres espèces que celle issues de la dissociation de H₂O. Outre les ions OH⁻ et H⁺ qui participent aux réactions acide-base avec les groupements hydroxyle de surface, d'autres espèces ioniques sont généralement présentes au niveau de l'interface et dans certains cas, ces espèces peuvent se fixer sur l'oxyde

par adsorption spécifique. On parle alors de point isoélectrique (PIE) qui correspond au pH où la concentration des espèces positives en surface est égale à la concentration des espèces négatives, le bilan des charges de surface faisant intervenir l'ensemble des espèces adsorbées, y compris les H^+ et OH^- . Le PIE correspond à une charge de surface « effective » nulle. Il est déterminé généralement par des méthodes électrocinétiques (électrophorèse, zétamétrie) à la différence du PZC qu'on obtient, le plus souvent, par des méthodes de titrage. Nous pouvons noter que les valeurs de PZC et PIE seront les mêmes en l'absence d'adsorption spécifique d'ions de la solution aqueuse autre que H^+ et OH^- . L'observation d'une différence entre le PZC et PIE permet de mettre en évidence l'adsorption spécifique d'impuretés anioniques ou cationiques.

À la surface d'un oxyde de titane, en fonction du pH de la solution, nous pouvons donc avoir différentes espèces (ou différents sites) dont le diagramme de prédominance est donné sur la figure 48.

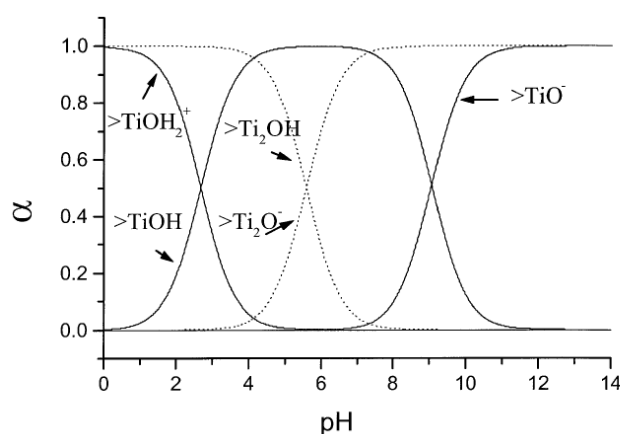


Figure 48 : Diagramme de prédominance du TiOH des espèces de surface présentes en fonction du pH. En ordonné : % des espèces, en abscisse : le pH.

Il est possible de constater qu'il existe plusieurs types de sites à la surface du substrat en fonction de l'acido-basicité. Chacune de ces espèces de surface représentée sur le schéma de la figure ci-dessus peut intervenir dans des réactions acide-base spécifiques caractérisées par des constantes d'équilibre que l'on trouve dans la littérature (Figure 49).

Proposed reactions at the TiO_2 surface	pK
Oxygen mono-coordinated Ti(1):	
$>Ti-OH_2^+ \rightarrow >Ti-OH + H^+$	2.60
$>Ti-OH \rightarrow >Ti-O^- + H^+$	9.00
Oxygen di-coordinated Ti(2):	
$>Ti_2=OH \rightarrow >Ti_2=O^- + H^+$	5.50

Figure 49 : Valeurs des pKa des principaux sites échangeurs de protons à la surface de l'oxyde de titane ; d'après Oliva et al. 2003 (96).

Ces concepts de charge de surface en relation avec l'existence de sites cationiques ou anioniques dont la protonation dépend du pH de la solution ont été utilisés dans la construction

de modèles légèrement plus sophistiqués et abondamment utilisés dans la littérature. Par exemple, le modèle MUSIC (97) permet de décrire la surface d'un oxyde et son acido-basicité. Grâce à lui, par analogie avec les complexes en milieu aqueux, il est possible de décrire toutes les interactions entre les ions adsorbés et le solide soit par des liaisons électrostatiques soit par des liaisons covalentes.

À la lumière de ces concepts simple d'acido-basicité de surface, il est plus aisé de comprendre les résultats de photoémission.

Le signal observé en XPS provient du plan de surface lui-même et d'une certaine épaisseur sous la surface du matériau. Le principe de base, même si dans le cas des nanostructures créées celui-ci peut être discuté, consiste à découper le solide, sur le plan théorique, en plans atomiques parallèles. Il faut supposer que chacun de ces plans possède une épaisseur d_0 émettent une intensité I_0 vers l'interface solide-vide. L'intensité émise par un plan sous le plan surface (premier plan en contact avec le vide) est écranté par les plan supérieurs et le signal est donc atténué. La loi d'atténuation couramment admise est la loi de type Beer-Lambert (atténuation exponentielle). L'intensité globale émanant de la surface du solide est donc une somme des intensités écrantées par les plans supérieurs. La grandeur physique qui caractérise cet écrantage est le libre parcours de transport λ . Dans le cas d'oxydes et pour des énergies cinétiques de photoélectrons de l'ordre de 500 eV, celui-ci vaut approximativement 1.0 nm. Cela signifie qu'un photoélectron qui se propage dans le solide parcourt environ 1.0 nm entre 2 collisions à l'intérieur du solide. L'ensemble de ces hypothèses sont réunies dans la figure 50 suivante.

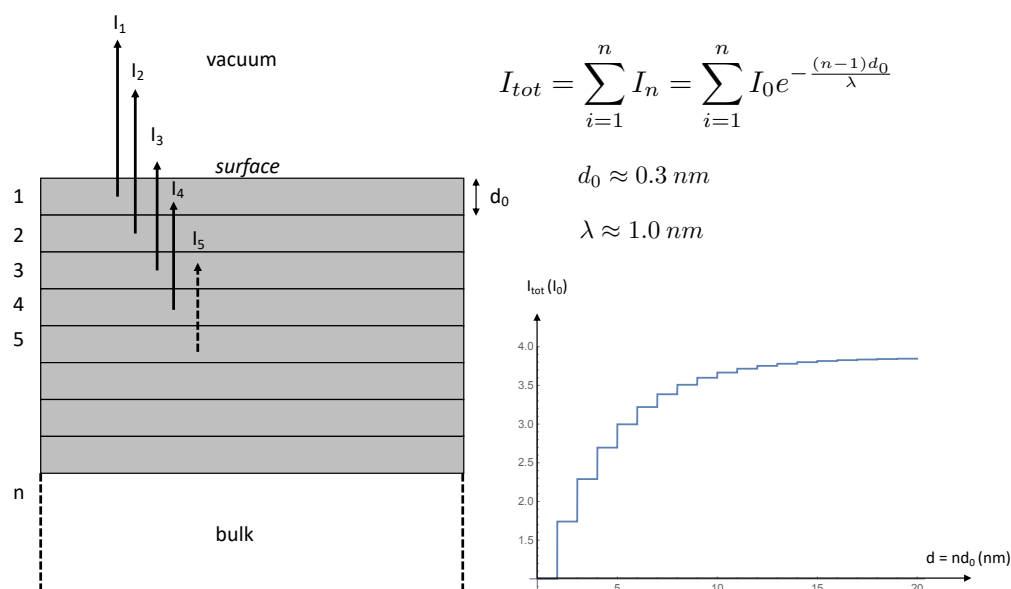


Figure 50 : Explication de la loi d'atténuation : l'intensité globale émanant de la surface du solide est en réalité une somme des intensités (I_5 ; I_4 ; I_3 ; I_2) écrantées par le plan supérieur (I_1).

À partir de ces suppositions, il est possible d'émettre l'hypothèse que 33% du signal détecté en XPS proviennent du premier plan de surface et que les 67% restants émanent des plans sous-jacents. En admettant que seul le premier plan contient des hydroxyles et de l'eau coordonnée,

une estimation de la concentration de surface des OH et H₂O de surface à partir de nos mesures XPS est possible.

Supposons que θ soit le taux de couverture en sites hydroxylés (Ti-OH) ou hydratés (Ti-H₂O). Nous avons observé sur le pic O_{1s} un pourcentage de O²⁻ (pic d'énergie de liaison la plus faible correspondant aux anions du réseau de TiO₂) de l'ordre de 80% et donc environ 20% de OH et H₂O. Suivant le modèle simple présenté ci-dessus, nous aurions :

$$80\% I_0 = 67\% I_0 + (1-\theta) 33\% I_0$$

soit approximativement $\theta = 0.60$. Ce résultat est une approximation grossière qui repose sur l'incertitude de la valeur du libre parcours moyen et la structure réelle en plans de la zone de surface du solide. D'après les mesures XPS précédemment exposées, nous pouvons estimer qu'environ 60% des sites de surface seraient hydroxylés ou hydratés. La décomposition du pic O_{1s} donnait deux fois plus de OH que de H₂O (respectivement $\approx 14\%$ et $\approx 7\%$) et il est possible d'estimer, grâce à nos données de photoémission, les concentrations des différents sites de surface (Tableau 9).

Tableau 9 : Pourcentage des différents sites présents sur le premier plan de surface. Les % surfaciques expérimentaux sont issus des calculs estimatifs présentés dans le texte pour exploiter la mesure XPS du pic O_{1s}. (*) les % surfacique théoriques reposent sur des calculs faits pour des faces de type (100) et (110) de l'anatase et du rutile ; d'après Connor et al. 1999 (98).

Sites	% surfacique expérimental	% surfacique théorique (*)
Ti ₂ O ⁻	40	$\approx 45\%$
Ti ₂ OH ⁺ TiOH	40	$\approx 5-10\%$ et $\approx 5-10\%$
TiOH ₂ ⁺	20	$\approx 45\%$

Nous observons un accord à peu près correct pour les sites non protonés, mais une discordance entre les pourcentages de sites hydroxylés et des sites hydratés : le modèle prévoit beaucoup plus de sites hydratés de type TiOH₂⁺ que de sites hydroxylés de type Ti₂OH⁺ et TiOH par rapport à ce que nous observons par XPS. Ce désaccord peut avoir deux origines. La première vient du fait que les calculs de Connor et al. 1999 (98) ont été réalisés sur des surfaces d'anatase et de rutile d'orientation bien spécifique. Dans notre étude, nous travaillons sur des surfaces nanostructurées de type nanotube, donc différentes d'un plan cristallographique parfait de type (100) ou (110), même si, localement nous pouvons y retrouver des coordinances locales d'anions et de cations qui sont voisines. La seconde, et qui est peut-être la plus importante, vient de la méthode d'analyse. L'analyse XPS est réalisée sous UHV, et sous vide, l'eau moléculairement adsorbée pourrait désorber ou participer à un processus de réarrangement atomique de ces sites de surface avec transformation en hydroxyles.

Pour conclure sur l'analyse par XPS des surfaces de Ti6Al4V obtenues par SLM et modifiée par anodisation, il est possible de retenir que ces dernières sont fortement hydroxylées ou hydratées (de l'ordre de 50%) et cela de manière relativement indépendante du pH de la solution d'immersion. Elles contiennent également des ions fluorure et acétate qui viennent évidemment

de la solution de synthèse des nanotubes. Ces derniers ions sont potentiellement déplaçables ou échangeables lors de l'adsorption de molécules plus importantes comme des protéines. Ainsi, une évaluation des propriétés d'adsorption de ces surfaces est réalisée.

III-3-2-3 Résultats de l'analyse IRAAS & discussion

Dans cette deuxième partie de l'étude, l'objectif était d'évaluer la capacité des surfaces nanostructurées à interagir avec des biomolécules de taille conséquente, comparable à celle qui peuvent être présentes dans le milieu biologique humain.

Le collagène et la gélatine sont des protéines de choix car elles sont retrouvées en grande quantité dans la matrice extracellulaire et notamment dans le tissu conjonctif gingival. Si ce type de biomolécules interagit favorablement avec les surfaces nanostructurées, il est possible d'imaginer une fonctionnalisation de ces surfaces en greffant du collagène ou de la gélatine pour qu'elles soient favorablement reconnues par les cellules colonisatrices au moment de l'insertion du biomatériau.

L'interaction entre la surface couverte de nanotubes et la biomolécule peut se faire grâce à des interactions faibles par liaisons hydrogène et par des liaisons fortes de type électrostatique entre les groupements d'acides aminés ionisables. La figure 51 montre la composition moyenne en acides aminés d'une des hélices de collagène. Les principaux acides aminés susceptibles de se lier à la surface sont l'hydroxyproline, l'arginine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

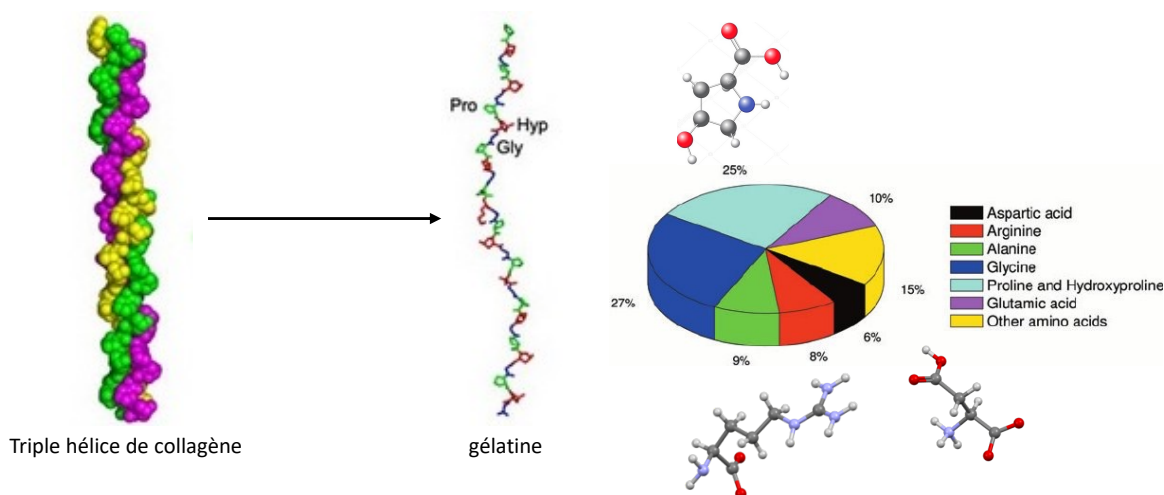


Figure 51 : Composition de représentation moléculaire du collagène (triple hélice à gauche de la figure), d'une des 3 hélices de tropocollagène (au centre) et de la répartition en pourcentage des acides aminés composants ce type de protéine (à droite).

L'adsorption de gélatine a été évaluée (une des trois hélices du collagène) par immersion des surfaces de six échantillons (n=6) préalablement anodisées dans une solution de gélatine de concentration 0.1g.L^{-1} . Le pH de la solution a été ajusté à 5.0 et à 8.3 pour regarder l'influence de ce dernier sur l'adsorption, en se plaçant de part et d'autre du PZC moyen de TiO_2 . Différents temps d'immersion ont été imposés et l'adsorption a pu être suivi par infrarouge. Une dernière caractérisation des surfaces a été réalisée par XPS et les échantillons ont été passés au MEB.

La figure 52 montre l'évolution des spectres IR pour les 2 pH étudiés sur les 6 échantillons SLM préparés à différentes conditions anodiques en termes de tension (10V-20V-30V).

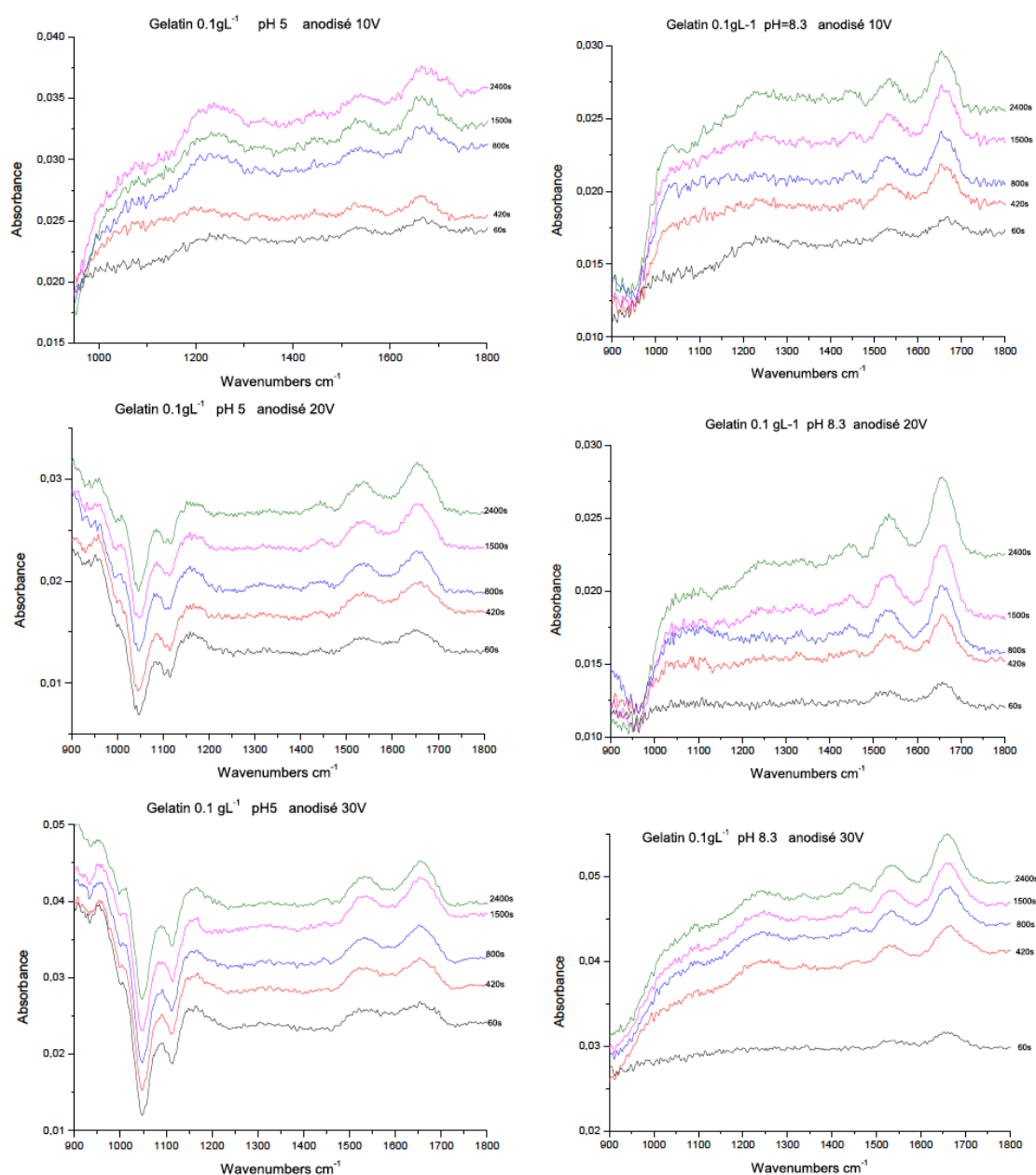


Figure 52 : Spectres infrarouges obtenus en réflexion-absorption montrant l'évolution temporelle de la zone spectrale 900-1880 cm^{-1} où se trouvent les bandes amides I, II et III caractéristiques des protéines. Le temps d'immersion total des échantillons dans une solution de collagène de concentration 0.1g.L^{-1} est indiqué à droite de chaque spectre. Les séries des échantillons anodisés 10V, 20V et 30V sont représentées pour 2 pH de la solution d'immersion.

Il est facile de remarquer que dans la zone spectrale allant de 1300 à 1800 cm^{-1} , les spectres sont dominés par 3 bandes d'absorption situées vers 1450, 1550 et 1670 cm^{-1} . Ces 3 bandes d'absorption correspondent aux bandes amides I, II et III caractéristiques des protéines (99) et impliquent des modes de vibration des liaisons impliquées dans la liaison peptidique (CO-NH) entre les acides aminés. En d'autres termes, il s'agit du signal qui est donné par la gélatine. La région spectrale la plus sensible aux structures secondaires de la protéine est la bande amide I localisée vers 1700–1600 cm^{-1} . Ce mode de vibration est presque entièrement dû aux

vibrations d'élongation de la double liaison C=O des liaisons peptidiques (environ 80 %) couplées à la déformation de la liaison NH. La fréquence de cette bande est sensible (déplacement) à la liaison hydrogène entre le C=O et le NH et donc à la fois à la nature de la chaîne latérale d'acides aminés et à la structure secondaire du squelette carboné de la protéine. Dans le cadre d'étude structurales de protéines par infrarouge, la bande amide I est reconnue pour être la mieux adaptée pour identifier des structures secondaires dans une protéine (hélices alpha, feuillet bêta, boucle et tours).

La bande amide II située dans la gamme spectrale 1500-1600 cm⁻¹, est quant à elle attribuée à la déformation de la liaison NH dans le plan (40-60%) et à la vibration d'élongation C-N (18-40%).

La bande d'absorption située vers 1200-1400 cm⁻¹ correspond quant à elle à la bande amide III. Cette vibration est une combinaison complexe de flexion de NH et de l'étirement C-N avec une contribution de la déformation de CN dans le plan et de l'étirement de la liaison C-C. Comme il est visible sur les spectres, le signal de la bande amide III est plus faible que l'amide I et l'amide II et est rarement utilisée pour l'identification structurale d'une protéine.

Afin de suivre la quantité de protéine adsorbée en fonction du temps d'immersion, l'aire sous les bandes d'absorption I, II et III a été mesurée. Sur la figure 53, les évolutions temporelles de la bande amide I et de la somme des 3 bandes d'absorption (I+II+III) sont reportés.

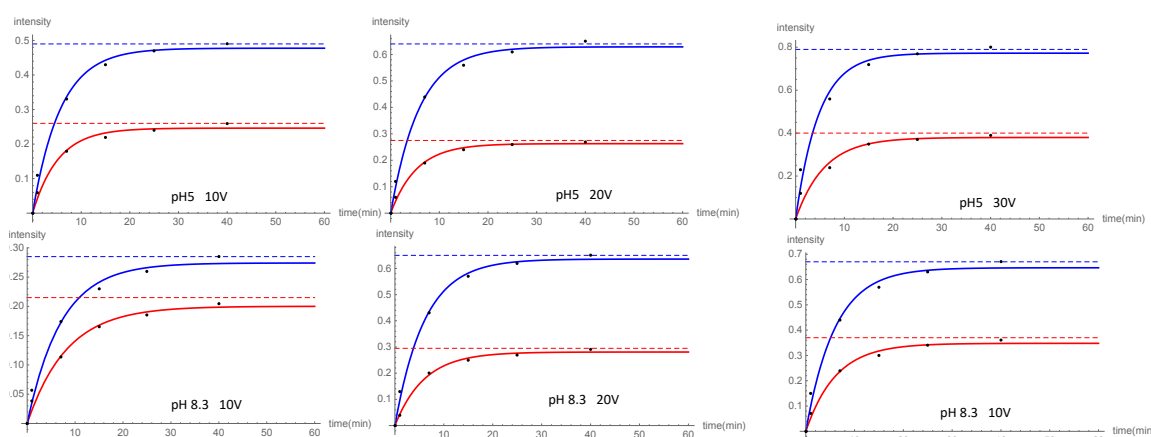


Figure 53 : Évolution de l'adsorption de la gélatine sur différentes surfaces de Ti6Al4V SLM anodisées (10V - 20V - 30V) en fonction du temps à différent pH et différents (5 et 8.3). En rouge : Évolution calculée à partir de l'aire sous la bande amide I et en bleu à partir de la somme des aires sous les 3 bandes amides.

Plusieurs remarques sur l'évolution des courbes s'imposent.

La première concerne l'évolution $A=f(t)$ qui peut être ajustée par une courbe de type exponentielle de la forme :

$$A(t) = v (1 - \text{Exp}[-w t])$$

Cette forme nous permet de déterminer expérimentalement **la valeur du plateau** (saturation en taux de couverture) et une **durée de demi-couverture** (équivalent de la durée de demi-vie en radioactivité), grandeurs qui peuvent être comparées en fonction de paramètres comme le pH où le diamètre des tubes.

La seconde concerne l'influence du pH de la solution qui semble ne pas avoir un effet important sur les cinétiques d'adsorption, notamment sur la valeur du plateau.

La troisième remarque concerne la valeur du plateau qui semble, elle, bien dépendre du diamètre des nanotubes. La synthèse de ces observations est présentée dans le tableau 11.

Tableau 10 : $\theta_{\max}$ dans ce tableau représente l'intensité de la bande d'absorption de la bande amide I relevée sur les cinétiques de la figure 53. $\theta_{1/2}$, représente le temps d'immersion au bout duquel 50% de l'absorption du plateau est atteinte : c'est le temps de demi-couverture.

	pH = 5			pH = 8.3		
	10V	20V	30V	10V	20V	30V
$\theta_{\max}$	0.26	0.29	0.40	0.21	0.30	0.37
$\theta_{1/2}$ (s)	275	245	230	325	260	245

Les mesures infrarouges montrent que :

- la quantité de gélatine adsorbée semble augmenter avec le diamètre des nanotubes
- le temps de demi-couverture semble décroître avec le diamètre des nanotubes.

En moyenne, le plateau est atteint après une vingtaine de minutes de trempage. En d'autres termes, au bout de 20 min, la surface a atteint son maximum d'adsorption : tous les sites réactifs potentiels sont majoritairement occupés.

Le fait que le temps de demi-couverture décroisse avec le diamètre des nanotubes pourrait indiquer une réactivité supérieure et donc une adsorption plus rapide de la gélatine sur la surface nanostructurée lorsque le diamètre est faible (sites potentiels d'accrochage plus nombreux).

Le fait que le taux de couverture à saturation augmente avec le diamètre est en accord avec le calcul de l'épaisseur des parois réalisé dans la partie précédente de l'étude. En effet, l'épaisseur de paroi augmente avec le diamètre : plus le diamètre est grand, plus l'épaisseur des parois est importante et plus la densité surfacique de site d'accrochage est importante.

Cette hypothèse peut être vérifiée par calcul simple de densité surfacique de site d'accrochage. La figure 54 suppose un arrangement compact des nanotubes en réseau carré (ou hexagonal) avec λ_{lin} qui est la densité linéique de sites d'adsorption sur le bord des tubes et σ_{surf} qui est la densité de sites par unité de surface. Dans le cas où λ_{lin} est constant, σ_{surf} est proportionnelle à λ_{lin} et inversement proportionnelle au diamètre « d » des nanotubes. Ce modèle stipule que plus les NT sont larges, moins la densité de sites par unité de surface est importante.

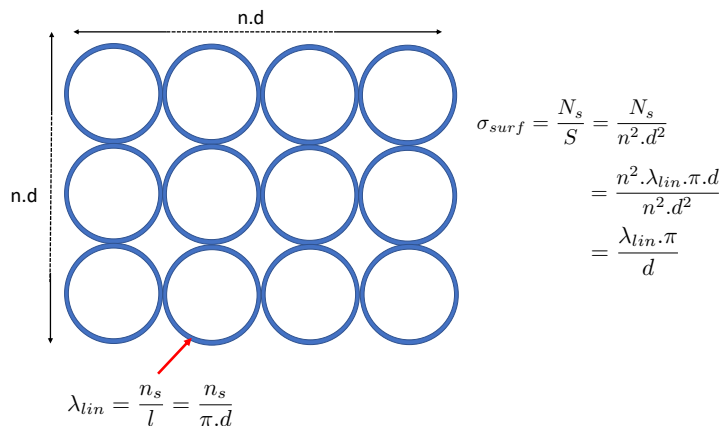


Figure 54 : Réseau carré compact de NT de diamètres « d ». La densité linéique de sites réactifs sur le bord des tubes est représentée par λ_{lin} et la densité surfacique totale (ensemble des tubes) est σ_{surf} .

Pour expliquer l'augmentation de $\theta_{\max}$ avec le diamètre des tubes, il faut donc soit que λ_{lin} augmente avec le diamètre (et ceci plus vite que « d »), soit que les biomolécules pénètrent dans les tubes. Les deux hypothèses semblent justes.

Le spectre XPS de la figure 55 représente le *survey* de l'échantillon anodisé à 10V ayant été immergé 40 min dans la solution de gélatine de pH 8.5, puis rincé à l'eau dé-ionisée et nettoyé 3 minutes par ultra-sons.

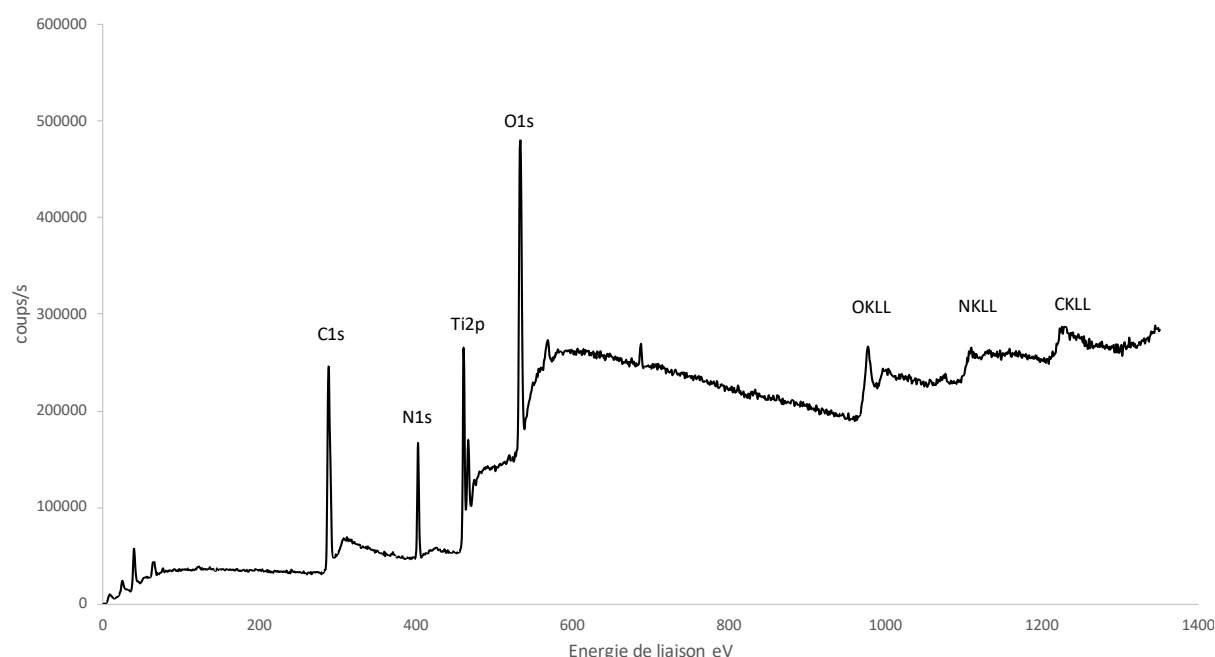


Figure 55 : Survey de l'échantillon anodisé à 10V ayant été immergé 40 min dans la solution de gélatine de pH 8.5, puis rincé à l'eau dé-ionisée et nettoyé 3 minutes par ultra-sons.

Le spectre présente pic important vers 400 eV qui correspond au niveau 1s de l'azote et qui atteste de la présence de la gélatine adsorbée sur la surface (N des liaisons amides et des groupements contenant des fonctions NH). Le tableau 12 donne le pourcentage atomique des différentes espèces détectées par XPS pour les échantillons anodisés à 10V, 20V et 30V.

Tableau 11 : % atomique des différentes espèces détectées par XPS pour les échantillons de Ti6Al4V SLM anodisés à 10V, 20V et 30V.

	10V	20V	30V
C	48.9 %	45.7 %	49.1 %
N	10.5 %	11.2 %	10.3 %
O	31.2 %	33.9 %	32.5 %
Ti	7.3 %	7.5 %	6.9 %
Al	0.6 %	0.1 %	0.1 %
F	1.5 %	1.6 %	1.1 %

Les pourcentages atomiques observés paraissent relativement similaires, quel que soit le diamètre moyen des nanotubes présents sur la surface anodisée. Dans le tableau 13, les valeurs observées sont comparées avec les pourcentages élémentaires des acides aminés qui composent la gélatine, nous devrions obtenir %C_{gel} = 50.8 ; %O_{gel} = 34.5 ; %N_{gel} = 14.7. L'accord entre les valeurs observées et les valeurs « théoriques » est satisfaisant.

Tableau 12 : % élémentaires des acides aminés composant la gélatine (en jaune)

Acides aminés	%C	%N	%O	%AA gélatine
ala	50	17	33	9
arg	50	17	33	8
asp	44	12	44	6
asn	44	23	33	
cys	50	17	33	
glu	50	10	40	10
gln	50	30	20	
gly	40	20	40	27
his	54	19	27	
ile	66	12	22	
leu	66	12	22	
lys	60	20	20	
met	67	11	22	
phe	75	8	17	
pro	63	12	25	25
OHpro	56	11	33	
ser	43	14	43	
thr	50	13	37	
trp	72	14	14	
tyr	70	8	22	
val	62	13	25	

Toutefois, le pourcentage en azote est sous-estimé dans les mesures réalisées : environ 10% au lieu de 15%. Cela peut être expliqué par les atomes d'oxygène et de carbone n'appartenant pas à la gélatine (O de Ti-O et C de contamination ou de CH₃COOH des zones non couvertes) et qui sont comptés dans le pourcentage des espèces détectées par XPS. Puisque l'azote est un contaminant de surface de très faible concentration, quasiment inexistant sur les surfaces non recouvertes, il est possible d'estimer le taux de couverture :

$$\theta_{\text{couv}} * 15\% = 10\% \quad \text{soit} \quad \theta_{\text{couv}} \approx 2/3$$

Les zones recouvertes par la gélatine correspondraient donc à approximativement 2/3 de la surface. Ces résultats sont comparés aux images issues de l'observation au MEB d'un échantillon anodisé à 20 V pendant 1h et traité dans les mêmes conditions (Figure 56). À fort grossissement, il est possible d'observer que la gélatine adsorbée est située sur le bord des nanotubes ainsi que dans les zones intertubulaires. La différence entre l'estimation de la quantité adsorbée par XPS et celle estimée par MEB doit correspondre à la quantité de gélatine localisée dans la région intertubes. Cette gélatine est solidement accrochée à la surface puisqu'elle car elle résiste à un nettoyage aux US pendant plusieurs minutes.

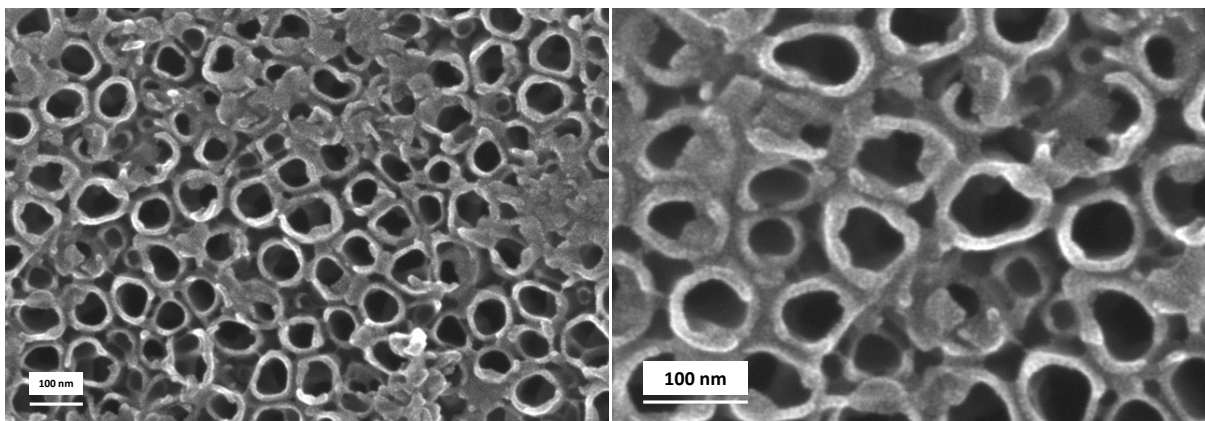


Figure 56 : Images de MEB permettant de visualiser où la répartition de la gélatine adsorbée sur un échantillon de Ti6Al4V SLM anodisée à 20 V pendant 1h. L'échantillon a été trempé pendant 20 min dans un bain de gélatine à 0.1g.L⁻¹ de pH=8.3 puis passé aux US pendant 5 min avant d'être séché à l'air ambiant puis métallisé avant observation.

Avant de conclure, il est important de présenter les cinétiques par infra-rouge obtenues sur les deux échantillons contrôle (n=2) **non anodisés** et ayant subi le même protocole de trempage dans les 2 solutions à pH 5 et 8.3.

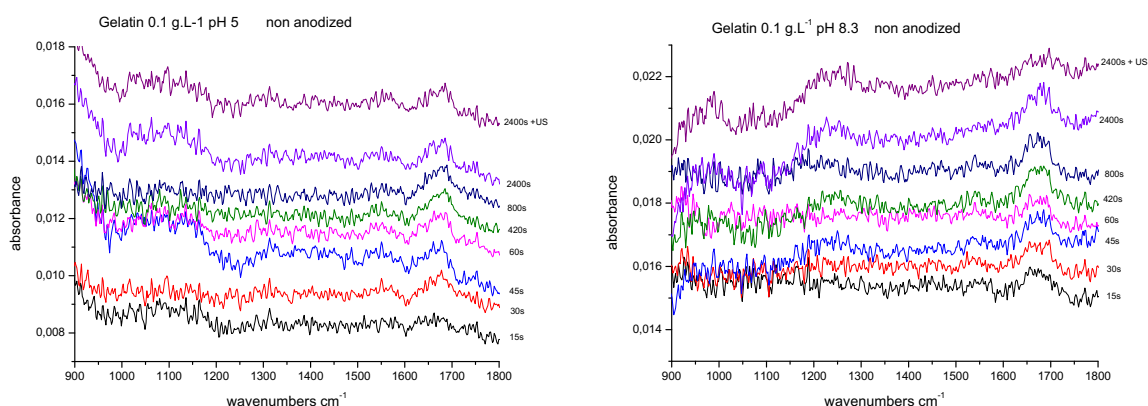


Figure 57 : Spectres infrarouges obtenus en réflexion-absorption montrant l'évolution temporelle de la zone spectrale 900-1880 cm⁻¹ où se trouve les bandes amides I, II et III caractéristiques des protéines pour 2 échantillons contrôle non anodisés obtenus par usinage.

L'aire des pics d'adsorption de la bande amide est 10 à 20 fois moins importante que pour les valeurs obtenues pour les surfaces anodisées. La quantité de gélatine sur les surfaces non nanostructurées est donc 10 à 20 fois plus faible, que ce soit avant ou après passage au US.

III-3-2-4 Synthèse

Les analyses conjointes de photoémission, de spectroscopie infrarouge et de microscopie électronique à balayage permettent de mettre en évidence l'existence de sites réactifs spécifiques sur les surfaces nanostructurées élaborées. Pour préciser la nature de ces sites et leur rôle dans les processus d'adsorption, d'autres expériences, par adsorption de molécules « sondes » seraient nécessaires, mais sortent du cadre de ce travail.

L'interaction de ces surfaces nanostructurées avec une biomolécule comme la gélatine montre que celle-ci se greffe spontanément et très rapidement sur la surface. Les liaisons chimiques molécule-surface sont fortes (résistance de l'accrochage à un bain sous ultra-sons), ce qui n'est pas le cas sur un échantillon contrôle dont la surface n'a pas subi d'anodisation. La microscopie électronique à balayage montre que la gélatine vient « décorer » les bords des nanotubes, endroit où la densité de défauts doit être importante et donc où les sites de surface sont les plus réactifs.

Les résultats montrent qu'une fonctionnalisation de surface supplémentaire par greffage de gélatine peut être envisagée en plus de la nanostructuration sur une surface de Ti6AL4V obtenue par SLM et préalablement polie.

Conclusion, limites et perspectives

L'objectif principal de cette thèse a été d'évaluer les propriétés mécaniques et biologiques des pièces en Ti6Al4V obtenues par SLM. Une première partie s'est attachée à étudier le comportement mécanique des pièces mises en forme par ce procédé additif en fonction des normes utilisées pour des alliages usinables. La deuxième partie de ce travail a concerné l'étude de la biocompatibilité et plus spécifiquement du comportement vis-à-vis de l'adhésion cellulaire de ces pièces réalisées par microfusion laser sur lit de poudre d'alliage de titane.

Sur le plan mécanique, sous réserves d'avoir optimisé les paramètres de fabrication et ceux des post traitements thermiques, les pièces ainsi fabriquées ont présenté des propriétés mécaniques compatibles avec la réalisation de dispositifs prothétiques selon la norme ISO 22674. De plus, elles ont également présenté un comportement similaire en termes de module d'Young, de limite d'élasticité et de résistance maximale à la traction, à l'alliage de titane de grade 5 conventionnellement mis en forme par usinage.

Néanmoins, il a été montré que la ductilité de pièces obtenues par SLM, dans les conditions étudiées, s'avère inférieure comparativement à celles produites par usinage. Pour garantir un allongement à la rupture suffisant, les conditions de production doivent être maîtrisées et contrôlées régulièrement. Ainsi, il faut veiller en particulier à limiter le recyclage de la poudre, celle-ci étant contaminée par l'oxygène lors des réutilisations successives. Enfin, aucune caractérisation mécanique en fatigue n'a été rapportée dans cette thèse. Cette propriété correspondant au comportement mécanique d'un matériau sous efforts répétés représente un facteur essentiel pour estimer la pérennité des pièces produites soumises aux contraintes fonctionnelles répétées qui vont s'exercer lors de leur utilisation quotidienne. Cette analyse en fatigue, qui devra être menée dans des conditions spécifiques imitant les conditions buccales, devra venir confirmer à l'avenir les résultats mécaniques présentés ici.

Concernant la biocompatibilité, les résultats des tests de cytotoxicité *in vitro* ont montré que les cellules fibroblastiques étudiées se comportent de manière similaire tant sur une surface de Ti6Al4V obtenue par SLM que sur une surface de Ti6Al4V obtenu par usinage. Pour cela, la surface de la pièce doit avoir préalablement subi un polissage mécanique garantissant une rugosité inférieure à 0.2 μm . Sur une surface brute de fabrication en alliage de titane mis en forme par SLM, la rugosité est de l'ordre d'une dizaine de microns. Dans cette situation, les cellules fibroblastiques ont tendance à présenter une morphologie plus favorable à l'adhésion que sur une surface polie mécaniquement ou que sur une surface brute sortie d'usinage.

Cette étude de la cytotoxicité directe devra être complétée par une évaluation des produits de relargage afin de s'assurer de l'innocuité totale du matériau comme par exemple l'absence d'ions métalliques dans le milieu de culture.

Ainsi, à l'issue de ces travaux, ces résultats contribuent à montrer que le procédé de mise en forme par SLM est une méthode de fabrication viable pour la production de pièces prothétiques implanto-portées à partir d'une poudre de Ti6AL4V de grade 23.

Concernant le volet biologique des travaux effectués, les résultats et les hypothèses qui en

émergent s'inscrivent dans le débat actuel concernant la supériorité des surfaces « rugueuses » ou des surfaces « polies » pour optimiser leur intégration au sein des tissus mous péri-implantaires. Cette problématique pour laquelle il n'existe pas encore de consensus s'avère essentielle afin de concevoir des pièces prothétiques favorisant une résistance à l'inflammation des tissus gingivaux péri-implantaire ou mucosite, pathologie évoluant fréquemment vers la destruction du tissu osseux sous-jacent ou péri-implantite, prélude à la perte implantaire.

Dans cette optique, ce travail de recherche s'est orienté secondairement vers les possibilités de modifications électrochimiques de la surface de ces pièces produites par SLM. **Ainsi l'objectif secondaire de cette thèse a été la synthèse et la caractérisation d'une surface de Ti6Al4V nanostructurée par oxydation anodique.**

En se basant sur un protocole corrélant des images issues de MEB et d'EBS, les résultats des travaux effectués montrent que l'oxydation anodique peut être appliquée pour modifier des surfaces de Ti6Al4V obtenues par SLM. L'analyse chimique montre que les surfaces ainsi obtenues, présentant des NT relativement homogènes sur la phase α , et améliorent la réactivité de surface comparativement aux surfaces polies, que ça soit grâce à la nano-topographie qu'elles engendrent ou à la chimie particulière de la couche de TiO_2 . Un diamètre des tubes de 90 nm associé à une épaisseur de paroi d'environ 10 nm est apparue comme étant favorable pour améliorer l'adsorption de gélatine comparativement à des diamètres plus petits.

L'anodisation a été utilisée dans ce travail sur une surface polie de Ti6Al4V obtenue par SLM, mais il est possible d'envisager cette modification sur des surfaces de Ti6Al4V SLM brute de fabrication. La suite logique sera de déterminer l'influence de ces surfaces Ti6Al4V SLM modifiée par anodisation sur le comportement en termes d'adhésion *in vitro* des cellules gingivales. En complément, l'adhésion bactérienne d'une flore spécifique des maladies parodontales devra être évaluée.

Néanmoins, sur un plan pragmatique il reste à s'interroger sur les possibilités d'intégration de cette étape d'anodisation dans la chaîne de production actuelle pour modifier les dispositifs prothétiques implanto-portés, ainsi que sur les modalités pratiques d'utilisation clinique. En effet, la réactivité des surfaces traitée par anodisation nécessite probablement que cette étape de modification soit effectuée juste avant la mise en bouche, pour éviter toute contamination définitive de la couche de TiO_2 .

Concernant le procédé de mise en forme par SLM, même si les résultats présentés ici s'avèrent positifs en termes de comportement mécanique et biologique il ne faut pas oublier que ces méthodes de fabrication sont soumises à des difficultés techniques. Comme il a été mentionné dans ce travail, certaines de ces difficultés sont en rapport avec les conditions de fabrications liées au procédé SLM (traitement de la poudre, post-traitements des pièces) alors que d'autres sont en rapport avec les temps de production. Si la fabrication en tant que telle est de l'ordre d'une dizaine d'heures pour un plateau de plusieurs éléments prothétiques, la totalité des étapes (décrochage des supports et post-traitements) peut prendre jusqu'à plusieurs jours. De même, et par comparaison avec les procédés actuels de mise en forme par usinage, la fusion sur lit de poudre permet d'éviter les pertes de matière et l'usure de fraises mais il est actuellement difficile d'établir si le procédé SLM s'avère économiquement plus avantageux.

La loi précise que le praticien est prescripteur d'un dispositif prothétique réalisé « à façon » par un technicien de laboratoire. Il est le responsable du choix des matériaux mis en forme et des performances des restaurations prothétiques mises en place. La technique SLM est un procédé destiné à prendre de l'ampleur ces prochaines années pour la fabrication des dispositifs prothétiques supra-implantaires. Dans ce cadre, il s'avère utile de connaître les modifications majeures qui apparaissent et se développent autour de la mise en forme des matériaux par cette technique. D'autres développements complémentaires à ce mode de production devront permettre à l'avenir une amplification de ses applications en odontologie prothétique.

Bibliographie

1. Simon H, Yanase RT. Terminology for implant prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(4):539-43.
2. International Organization for Standardization. ISO 16443:2014. « Médecine bucco-dentaire — Vocabulaire des systèmes d'implants dentaires et procédures associées ». ISO. 2014.
3. The Glossary of Prosthodontic Terms: Ninth Edition. *J Prosthet Dent*. 2017;117(5S):1-105.
4. Kok IDD, Katz LH, Duqum I. CAD/CAM Custom Abutments for Esthetic Anterior Implant-Supported Restoration: Materials and Design. *Curr Oral Health Rep*. 2018;5:121-6.
5. Brägger U, Heitz-Mayfield LJA. ITI Treatment Guide. Biological and Hardware Complications in Implant Dentistry. ITI. Vol. 8. Quintessence Publishing; 2008. 30 p.
6. Vaicelyte A, Janssen C, Borgne ML, Grosgeat B. Cobalt–Chromium Dental Alloys: Metal Exposures, Toxicological Risks, CMR Classification, and EU Regulatory Framework. *Crystals*. 2020;10(12):1151.
7. Alsahhaf A, Spies BC, Vach K, Kohal R-J. Fracture resistance of zirconia-based implant abutments after artificial long-term aging. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017;66:224-32.
8. Kim JS, Raigrodski AJ, Flinn BD, Rubenstein JE, Chung K-H, Mancl LA. In vitro assessment of three types of zirconia implant abutments under static load. *J Prosthet Dent*. 2013;109(4):255-63.
9. Stimmelmayer M, Sagerer S, Erdelt K, Beuer F. In vitro fatigue and fracture strength testing of one-piece zirconia implant abutments and zirconia implant abutments connected to titanium cores. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(2):488-93.
10. Wittneben JG, Gavric J, Belser UC, Bornstein MM, Joda T, Chappuis V, et al. Esthetic and Clinical Performance of Implant-Supported All-Ceramic Crowns Made with Prefabricated or CAD/CAM Zirconia Abutments: A Randomized, Multicenter Clinical Trial. *J Dent Res*. 2017;96(2):163-70.
11. Baltag I, Watanabe K, Kusakari H, Miyakawa O. Internal porosity of cast titanium removable partial dentures: Influence of sprue direction on porosity in circumferential clasps of a clinical framework design. *J Prosthet Dent*. 2002;88(2):151-8.
12. Broihanne G. Fonderie et moulage du titane et des alliages de titane . *Tech Ing*. 1995.
13. Sierraalta M, Vivas JL, Razzoog ME, Wang R-F. Precision of Fit of Titanium and Cast Implant Frameworks Using a New Matching Formula. *Int J Dent*. 2012;e374315.
14. Shah S, Veeraiyan D, Ganapathy D. Marginal Accuracy of Milled Versus Cast Cobalt Chromium Alloys in Long Span Implant-Supported Frameworks: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Adv Oral Res*. 2020;11:120-7.
15. Koutsoukis T, Zinelis S, Eliades G, Al-Wazzan K, Rifaiy MA, Al Jabbari YS. Selective Laser Melting Technique of Co-Cr Dental Alloys: A Review of Structure and Properties and Comparative Analysis with Other Available Techniques. *J Prosthodont*. 2015;24(4):303-12.
16. Lu Y, Gan Y, Lin J, Guo S, Wu S, Lin J. Effect of laser speeds on the mechanical property and corrosion resistance of CoCrW alloy fabricated by SLM. *Rapid Prototyp J*. 2017;23(1):28-33.
17. Chen H, Li H, Zhao Y, Zhang X, Wang Y, Lyu P. Adaptation of removable partial denture frameworks fabricated by selective laser melting. *J Prosthet Dent*. 2019;122(3):316-24.
18. Crenn M, Fabas M, Jardel V. Influence de la fabrication additive sur les pièces en Co-Cr destinées à un usage prothétique. *Cah Prothèse*. 2019;(187).
19. Xu D, Xiang N, Wei B. The marginal fit of selective laser melting-fabricated metal crowns: an in vitro study. *J Prosthet Dent*. 2014;112(6):1437-40.
20. Huang Z, Zhang L, Zhu J, Zhang X. Clinical marginal and internal fit of metal ceramic crowns fabricated with a selective laser melting technology. *J Prosthet Dent*. 2015;113(6):623-7.
21. Berberi A, Tehini G, Rifai K, Bou Nasser Eddine F, Badran B, Akl H. Leakage evaluation of original and compatible implant-abutment connections: In vitro study using Rhodamine B. *J Dent Biomech*. 2014;5:1758736014547143.
22. Liu Y, Wang J. Influences of microgap and micromotion of implant-abutment interface on marginal bone loss around implant neck. *Arch Oral Biol*. 2017;83:153-60.

23. Journeau L, Debeauvais B, Bellanger S. Le Workflow des productions dentaires par Micro Fusion Laser Métal. Webinaire. 2021.
24. Revilla-León M, Sadeghpour M, Özcan M. A Review of the Applications of Additive Manufacturing Technologies Used to Fabricate Metals in Implant Dentistry. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont.* 2020;29(7):579-93.
25. Revilla-León M, Sánchez-Rubio JL, Pérez-López J, Rubenstein J, Özcan M. Discrepancy at the implant abutment-prosthesis interface of complete-arch cobalt-chromium implant frameworks fabricated by additive and subtractive technologies before and after ceramic veneering. *J Prosthet Dent.* 2021;125(5):795-803.
26. Revilla-León M, Meyer MJ, Özcan M. Metal additive manufacturing technologies: literature review of current status and prosthodontic applications. *Int J Comput Dent.* 2019;22(1):55-67.
27. Andreau O. Nocivité en fatigue et contrôle de défauts produits par fabrication additive [These de doctorat]. Paris, ENSAM; 2019.
28. Shipley H, McDonnell D, Culleton M, Coull R, Lupoi R, O'Donnell G, et al. Optimisation of process parameters to address fundamental challenges during selective laser melting of Ti-6Al-4V: A review. *Int J Mach Tools Manuf.* 2018;128:1-20.
29. ASTM F2924 « Standard Specification for Additive Manufacturing Titanium-6 Aluminum-4 Vanadium with Powder Bed Fusion ». 2014.
30. Combres Y. Traitements thermiques des alliages de titane. *Tech Ing.* 1995.
31. Strano G, Hao L, Everson R, Evans K. Surface roughness analysis, modelling and prediction in selective laser melting. 2013.
32. La fabrication additive des alliages métalliques. In: ISTE. 2022.
33. Song B, Dong S, Zhang B, Liao H, Coddet C. Effects of processing parameters on microstructure and mechanical property of selective laser melted Ti6Al4V. *Mater Des.* 2012;35:120-5.
34. Gong H, Rafi K, Gu H, Starr T, Stucker B. Analysis of defect generation in Ti-6Al-4V parts made using powder bed fusion additive manufacturing processes. 2014;1-4:87-98.
35. Gong X, Lydon J, Cooper K, Chou K. Beam speed effects on Ti-6Al-4V microstructures in electron beam additive manufacturing. *J Mater Res.* 2014;29(17):1951-9.
36. Vrancken B, Thijs L, Kruth J-P, Van Humbeeck J. Heat treatment of Ti6Al4V produced by Selective Laser Melting: Microstructure and mechanical properties. *J Alloys Compd.* 2012;541:177-85.
37. Yang J, Yu H, Yin J, Gao M, Wang Z, Zeng X. Formation and control of martensite in Ti-6Al-4V alloy produced by selective laser melting. *Mater Des.* 2016;108:308-18.
38. Benedetti M, Torresani E, Leoni M, Fontanari V, Bandini M, Pederzoli C, et al. The effect of post-sintering treatments on the fatigue and biological behavior of Ti-6Al-4V ELI parts made by selective laser melting. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2017;71:295-306.
39. AMS 2801 « Heat Treatment of Titanium Alloy Parts ». 2014.
40. Gil Mur FX, Rodríguez D, Planell JA. Influence of tempering temperature and time on the α' -Ti-6Al-4V martensite. *J Alloys Compd.* 1996;234(2):287-9.
41. Xu W, Brandt M, Sun S, Elambasseril J, Liu Q, Latham K, et al. Additive manufacturing of strong and ductile Ti-6Al-4V by selective laser melting via in situ martensite decomposition. *Acta Mater.* 2015;85:74-84.
42. International Organisation for Standardization. ISO 22674 « Dentistry-Metallic for fixed and removable restorations and appliances ». 2006.
43. Gorsse S, Hutchinson C, Gouné M, Banerjee R. Additive manufacturing of metals: a brief review of the characteristic microstructures and properties of steels, Ti-6Al-4V and high-entropy alloys. *Sci Technol Adv Mater.* 2017;18(1):584-610.
44. Agius D, Kourousis KI, Wallbrink C. A Review of the As-Built SLM Ti-6Al-4V Mechanical Properties towards Achieving Fatigue Resistant Designs. *Metals.* 2018;8(1):75.
45. Garboczi EJ, Lucon E, Grell W, Loftus Z, Kumosa M, Solis-Ramos E, et al. Effects of Powder Oxidation on Impact Toughness of Electron Beam Melt Ti-6Al-4V. 2017.
46. Lee W-H, Na T-W, Yi K-W, Yang S-M, Kang J-W, Kim HG, et al. Thermodynamic analysis of oxidation during selective laser melting of pure titanium. *Rapid Prototyp J.* 2020;26(8):1401-4.

47. Jung RE, Zembic A, Pjetursson BE, Zwahlen M, Thoma DS. Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 6:2-21.
48. Howe M-S, Keys W, Richards D. Long-term (10-year) dental implant survival: A systematic review and sensitivity meta-analysis. *J Dent.* 2019;84:9-21.
49. Simonis P, Dufour T, Tenenbaum H. Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(7):772-7.
50. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S257-66.
51. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang H-L. Peri-implantitis. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S267-90.
52. Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol.* 2015;42 Suppl 16:S158-171.
53. Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* oct 2012;23 Suppl 6:67-76.
54. Siebert C, Rieder D, Eggert J, Wichmann M, Heckmann S. Long-Term Esthetic Outcome of Tissue-Level and Bone-Level Implants in the Anterior Maxilla. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018;33(4).
55. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CHF. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(4):616-26.
56. Bollen CM, Papaioanno W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996;7(3):201-11.
57. Sawase T, Wennerberg A, Hallgren C, Miyamoto I, Albrektsson T. Atomic force microscopic study of commercially available implant abutments. *Clin Implant Dent Relat Res.* 1999;1(2):92-7.
58. Sawase T, Wennerberg A, Hallgren C, Albrektsson T, Baba K. Chemical and topographical surface analysis of five different implant abutments. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(1):44-50.
59. Quirynen M, Bollen CM, Willems G, van Steenberghe D. Comparison of surface characteristics of six commercially pure titanium abutments. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9(1):71-6.
60. Bouchard P. Parodontologie & dentisterie implantaire Volume 1 : médecine parodontale. In: Lavoisier Médecine Sciences. Paris, France; 2015.
61. Corvino E, Pesce P, Mura R, Marciano E, Canullo L. Influence of Modified Titanium Abutment Surface on Peri-implant Soft Tissue Behavior: A Systematic Review of In Vitro Studies. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2020;35(3):503-19.
62. Canullo L, Menini M, Santori G, Rakic M, Sculean A, Pesce P. Titanium abutment surface modifications and peri-implant tissue behavior: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2020;24(3):1113-24.
63. Pesce P, Menini M, Tommasato G, Patini R, Canullo L. Influence of modified titanium abutment surface on peri-implant soft tissue behaviour: A systematic review of histological findings. *Int J Oral Implantol Berl Ger.* 2019;12(4):419-29.
64. Sanz-Martín I, Sanz-Sánchez I, Carrillo de Albornoz A, Figuero E, Sanz M. Effects of modified abutment characteristics on peri-implant soft tissue health: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(1):118-29.
65. Zigterman BGR, Van den Borre C, Braem A, Mommaerts MY. Titanium surface modifications and their soft-tissue interface on nonkeratinized soft tissues-A systematic review (Review). *Biointerphases.* 2019;14(4):040802.
66. Guo T, Gulati K, Arora H, Han P, Fournier B, Ivanovski S. Orchestrating soft tissue integration at the transmucosal region of titanium implants. *Acta Biomater.* 2021;124:33-49.
67. Kunrath MF, Diz FM, Magini R, Galárraga-Vinueza ME. Nanointeraction: The profound influence of nanostructured and nano-drug delivery biomedical implant surfaces on cell behavior. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;284:102265.
68. Gil MS, Ishikawa-Nagai S, Elani HW, Da Silva JD, Kim DM, Tarnow D, et al. Comparison of the Color Appearance of Peri-implant Soft Tissue with Natural Gingiva Using Anodized Pink-Neck Implants and Pink Abutments: A Prospective Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34(3):752-8.
69. Zwilling V, Darque-Ceretti E, Boutry-Forveille A, David D, Perrin MY, Aucouturier M. Structure and

- physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy. *Surf Interface Anal.* 1999;27(7):629-37.
70. Gong D, Grimes CA, Varghese OK, Hu W, Singh RS, Chen Z, et al. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *J Mater Res.* 2001;16(12):3331-4.
 71. Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO₂ nanotubes: synthesis and applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(13):2904-39.
 72. Macak JM, Hildebrand H, Marten-Jahns U, Schmuki P. Mechanistic aspects and growth of large diameter self-organized TiO₂ nanotubes. *J Electroanal Chem.* 2008;621(2):254-66.
 73. Yasuda K, Schmuki P. Control of morphology and composition of self-organized zirconium titanate nanotubes formed in (NH₄)₂SO₄/NH₄F electrolytes. *Electrochimica Acta.* 2007;52(12):4053-61.
 74. Nobles KP, Janorkar AV, Williamson RS. Surface modifications to enhance osseointegration-Resulting material properties and biological responses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021;109(11):1909-23.
 75. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007;23(7):844-54.
 76. Zeng Y-J, Twan S-C, Wang K-W, Huang H-H, Hsu Y-B, Wang C-Y, et al. Enhanced Biocompatibility in Anodic TaOx Nanotube Arrays. *Nanoscale Res Lett.* 2017;12:557.
 77. Filova E, Fojt J, Kryslova M, Moravec H, Joska L, Bacakova L. The diameter of nanotubes formed on Ti-6Al-4V alloy controls the adhesion and differentiation of Saos-2 cells. *Int J Nanomedicine.* 2015;10(1):7145-63.
 78. Macak JM, Tsuchiya H, Taveira L, Ghicov A, Schmuki P. Self-organized nanotubular oxide layers on Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V formed by anodization in NH₄F solutions. *J Biomed Mater Res A.* 2005;75(4):928-33.
 79. Pruchova E, Kosova M, Fojt J, Jarolimova P, Jablonska E, Hybasek V, et al. A two-phase gradual silver release mechanism from a nanostructured TiAlV surface as a possible antibacterial modification in implants. *Bioelectrochemistry Amst Neth.* 2019;127:26-34.
 80. Regonini D, Bowen CR, Jaroenworarluck A, Stevens R. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. *Mater Sci Eng R Rep.* 2013;74(12):377-406.
 81. Xu R, Hu X, Yu X, Wan S, Wu F, Ouyang J, et al. Micro-/nano-topography of selective laser melting titanium enhances adhesion and proliferation and regulates adhesion-related gene expressions of human gingival fibroblasts and human gingival epithelial cells. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:5045-57.
 82. Baudin T. Analyse EBSD - Principe et cartographies d'orientations. *Tech Ing.* 2010.
 83. Amin Yavari S, Wauthle R, Böttger AJ, Schrooten J, Weinans H, Zadpoor AA. Crystal structure and nanotopographical features on the surface of heat-treated and anodized porous titanium biomaterials produced using selective laser melting. *Appl Surf Sci.* 2014;290:287-94.
 84. Xu W, Lui EW, Pateras A, Qian M, Brandt M. In situ tailoring microstructure in additively manufactured Ti-6Al-4V for superior mechanical performance. *Acta Mater.* 2017;125:390-400.
 85. Guo T, Oztug NAK, Han P, Ivanovski S, Gulati K. Old is Gold: Electrolyte Aging Influences the Topography, Chemistry, and Bioactivity of Anodized TiO₂ Nanopores. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021;13(7):7897-912.
 86. Béranger G, Mazille H. Approche scientifique des surfaces. Caractérisation et propriétés. *Tech Ing.* 2005;
 87. Leonardi S, Li Bassi A, Russo V, Di Fonzo F, Paschos O, Murray TM, et al. TiO₂ Nanotubes: Interdependence of Substrate Grain Orientation and Growth Characteristics. *J Phys Chem C.* 2012;116(1):384-92.
 88. Su Z, Zhang L, Jiang F, Zhou W, Deng Z, Cao Y, et al. Formation of anodic TiO₂ nanotube arrays with bimodal pore size distribution. *Electrochem Commun.* 2013;31:67-70.
 89. Xu J, Xu L-F, Wang J-T, Selloni A. The Reactivity of Anatase TiO₂ (211) Surface and the Bond- Charge Counting Model. *Titanium Dioxide.* IntechOpen; 2017.
 90. Bolt GH. Determination of the Charge Density of Silica Sols. *J Phys Chem.* 1957;61(9):1166-9.
 91. Parks GA, Bruyn PL de. The zero point of charge of oxides. *J Phys Chem.* 1962;66(6):967-73.
 92. Bérubé YG, de Bruyn PL. Adsorption at the rutile-solution interface: I. Thermodynamic and Experimental Study. *J Colloid Interface Sci.* 1968;27(2):305-18.
 93. Parks GA. The Isoelectric Points of Solid Oxides, Solid Hydroxides, and Aqueous Hydroxo Complex Systems. *Chem Rev.* 1965;65(2):177-98.

94. Morrison SR. The solid-liquid interface (Chapitre 2). In: Electrochemistry at semiconductor and oxidized metal electrodes. NYC: Plenum Press; 1980. p. 49.
95. Kosmulski M. The significance of the difference in the point of zero charge between rutile and anatase. *Adv Colloid Interface Sci.* 2002;99(3):255-64.
96. Oliva FY, Avalle LB, Cámara OR, De Pauli CP. Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO₂ particles, Part I. *J Colloid Interface Sci.* 2003;261(2):299-311.
97. Hiemstra T, Van Riemsdijk WH. A Surface Structural Approach to Ion Adsorption: The Charge Distribution (CD) Model. *J Colloid Interface Sci.* 1996;179(2):488-508.
98. Connor PA, McQuillan AJ. Phosphate Adsorption onto TiO₂ from Aqueous Solutions: An in Situ Internal Reflection Infrared Spectroscopic Study. *Langmuir.* 1999;15(8):2916-21.
99. Zeng H, Chittur KK, Lacefield WR. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials.* 1999;20(4):377-84.

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Exemple de différents types de pièces prothétiques implanta portées. A) Pilier droit standard ; source : Zimmer. B) Exemple d'une barre à section ronde reliant 4 implants destinée à supporter une prothèse complète par l'intermédiaire de cavaliers ; source : Straumann. C) Exemple d'une armature destinée à supporter le matériau cosmétique ; source : Straumann. D) et E) : Exemple de 2 piliers supportant une armature de bridge. Les piliers constituent l'infrastructure et l'armature la suprastructure ; source : Dentsply Sirona. E) Exemple de différentes armatures et barres présentant des architectures variées ; source : Straumann.	7
Figure 2 : Photographie représentant les 2 parties caractéristiques d'un pilier supra-implantaire ; source personnelle.	8
Figure 3 : Place de procédé SLM parmi les différentes techniques additives. En jaune : les catégories qui permettent de mettre en forme les alliages métalliques. En rose : le procédé communément utilisé en odontologie.	11
Figure 4: A) Photographies d'une armature de bridge obtenue par SLM et B) coupe transversale au niveau d'un pilier dentaire ; d'après Lu et al. 2017 (16). C) Photographie d'un châssis métallique obtenu par SLM ; d'après Chen et al. 2019 (17).	11
Figure 5 : A) Schématisation de la fabrication hybride proposée par la société HEXAGON. 1) les fichiers issus de la CAO sont 2) intégrés dans un logiciel qui permet de préparer les pièces pour la fabrication additive. A l'issue de la fabrication additive (3), le plateau sur lesquelles les pièces viennent d'être construites est 5) directement inséré dans la machine d'usinage puisque le fichier possède déjà les informations nécessaires à la reprise par usinage (4). Source : Webinaire « Le Workflow des productions dentaires par Micro Fusion Laser Métal » (23).	12
Figure 6 : Photographie d'un pilier supra-implantaire sur son plateau de fabrication obtenu par SLM. La partie la plus proche du plateau est destinée à être céramisée : l'état de surface brute SLM est conservé. La partie la plus éloignée du plateau a été reprise par usinage. Cette reprise concerne la connectique mais aussi la partie transgingivale. Source : « Le Workflow des productions dentaires par Micro Fusion Laser Métal » (23).	13
Figure 7 : Schéma du procédé SLM ; d'après Andreau 2019 (27).	15
Figure 8 : Schéma représentant les principaux paramètres clé du procédé SLM. Avec Laser Beam Power : puissance laser ; Focal Offset Distance : distance focale ; Scan Velocity : vitesse de balayage ; Powder Bed Temperature : température du lit de poudre ; Hatch Spacing : écart vecteur, Layer Thickness : épaisseur de couche ; Previous Layer : couches précédentes ; F-Théta lens : lentilles F-Theta ; d'après Shipley et al. 2018 (28).	16
Figure 9 : Cristallographie du titane pur ; d'après Combres 1995 (30).	17
Figure 10 : Surface d'une pièce obtenue par SLM avec la présence de particules non fusionnées. A gauche analyse de la topographie de surface par profilométrie mécanique et à droite l'image de la même zone observée au MEB. Source : personnelle.	18
Figure 11 : Microstructure colonnaire du Ti6Al4V issu de SLM ; d'après Vrancken et al. 2012 (36).	19
Figure 12 : Micrographie MEB d'une section de Ti6Al4V après attaque chimique révélant la microstructure ; d'après Yang et al. 2016 (34).	20
Figure 13 : Evolution de la limite d'élasticité de pièces en Ti6Al4V obtenues par FA en fonction de l'allongement à la rupture issues de 2 revues de la littérature. Le graphique A) représente différents procédés additifs. La plage jaune représente les valeurs pour des pièces issues de SLM avec ou sans post-traitements thermiques; d'après Gorsse et al. 2017(42). Le graphique B) représente l'évolution pour des pièces obtenues par SLM, avec ou sans post-traitements thermiques; d'après Agius et al. 2018 (43).	25
Figure 14 : Différence de la situation gingivale au niveau d'un implant Tissu Level et d'un implant Bone Level ; d'après Siebert et al. 2018 (54). Pour un implant Tissu Level, les tissus mous péri-implantaires se	

trouvent au niveau du col implantaire alors qu'ils se situent au niveau du composant prothétique transgingival pour un implant Bone Level.	27
Figure 15 : Photographies de la situation gingivale au contact de piliers, d'une barre ou d'une suprastructure. Source : personnelle.	28
Figure 16 : Supplementary Data. Images au microscope à fluorescence du tapis cellulaire arrivé à confluence sur une surface rugueuse obtenue par SLM à gauche (SLM-AS : SLM As-Built), et sur une surface lisse obtenues par usinage à droite (CNCM-MP : Computer Numerically Controlled Milled – Mechanically Polished).	38
Figure 17 : Différence entre la situation des tissus parodontaux au niveau d'une dent et celle des tissus mous péri implantaires au niveau du composant transgingival ; d'après Bouchard et al. 2015 (60).	39
Figure 18 : Pilier présentant un revêtement anodisé (XealMD). Source: Nobel Biocare.	41
Figure 19 : Couleurs du titane en fonction de l'épaisseur de la couche d'oxyde. Source : Balbachdamast, 2021.	41
Figure 20 : Schéma présentant des nanopores NP (à gauche) et des nanotubes NT (à droite) de Ti6Al4V.	42
Figure 21 : Schéma simplifié d'une cellule électrochimique pour une oxydation anodique.	42
Figure 22 : Migration des espèces lors de l'anodisation d'après Poulomi et al. 2011 (71). A) Migration des espèces chargées sans fluor. B) Migration des espèces chargées avec fluor. Les ions F^- ont la capacité de migrer à travers la couche d'oxyde jusqu'à l'interface métal/oxyde. Il se forme un complexe $[TiF_6]^{2-}$ soluble dans l'eau. Cette migration rapide conduit à la présence à l'accumulation de F^- à l'interface.	43
Figure 23 : Les différentes étapes pour permettre la croissance des NT d'après Macak et al. 2008 (72). À gauche, représentation schématique et à droite images de MEB associée vue du haut et en vue transversale. Le processus a été arrêté à 0 min (a), 3 min (b), 10 min (c), 30 min (d) et 1 h (e).	44
Figure 24 : Courbes courant-temps caractéristiques de l'anodisation sans fluor (a) et avec fluor (b) (71)... ..	45
Figure 25 : Variation du diamètre des NT en fonction de la tension d'anodisation ; d'après Macak et al. 2008 (72).	46
Figure 26 : Représentation schématique d'une cellule gingivale au contact d'une surface nanostructurée ; adaptée d'après Zeng et al. 2017 (76).	47
Figure 27 : A) Distribution granulométrique de la poudre. B) Visualisation de la sphéricité au MEB de la poudre.	72
Figure 28 : Machine SLM 125 HL et paramètres de fabrication.	73
Figure 29 : Explication du choix de l'orientation d'impression des disques.	73
Figure 30 : Principe de l'analyse cristallographique locale par EBSD ; d'après Baudin 2010 (82).	75
Figure 31 : Exemple d'un quadrillage permettant de délimiter 6 zones possibles d'exploration grâce à 12 indentations. Il a été décidé après observation de toutes les zones de cartographier à l'EBSD la zone délimitée par le carré rouge.	76
Figure 32 : Exemple de superposition de 2 acquisitions MEB/EBSD.	77
Figure 33 : Spectres DRX issus de l'analyse de l'échantillon avant et après post-traitements.	78
Figure 34 : Cartographies EBSD de la face supérieure des 4 échantillons avant anodisation selon la direction Z. A) B) C) échantillons obtenus par SLM ayant subi un post traitement D) échantillon de contrôle obtenu par usinage à partir d'un bloc de titane préalablement coulé.	78
Figure 35 : A) Visualisation au MEB d'une surface SLM de Ti6Al4V obtenue par SLM anodisée (20V-1 h). Il est possible d'observer les anciennes lattes α où les NT se sont créés et des zones « dissoutes » correspondant à la phase β inter-lattes. B) Sur ces phases β , une structure en « nid d'abeille » poreuse est mise en évidence à plus fort grossissement.	79
Figure 36 : Visualisation au MEB d'une surface de Ti6Al4V obtenue par usinage anodisée où il est possible d'observer que les NT se sont créés sur la structure équiaxe, alors que les joints de grains semblent dissous (20V-1 h).	79

Figure 37 : Résultat de l'analyse EDS : présence d'enrichissement en V et de déplétion en Al dans les anciens joints de grains beta.	80
Figure 38 : Image de MEB et résultats de la mesure du diamètre, de la longueur et de l'épaisseur des parois en fonction des conditions d'anodisation.....	81
Figure 39 : Diagramme représentant le diamètre des NT sur un échantillon de Ti6Al4V usiné et sur un échantillon de Ti6Al4V obtenu par SLM avec n= 120 mesures pour chaque échantillon anodisé à 20V pendant 1 h. ***** p<0.0001.....	82
Figure 40 : Différents types de plans cristallins sur une structure HC.	82
Figure 41 : Image de MEB et orientation cristallographique locale pour l'échantillon SLM 20V (code couleur en dessous).	83
Figure 42 : Moyenne ($\pm$ écart type) des données concernant le diamètre et la circularité. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes familles de plans cristallins à l'exception du diamètre sur l'échantillon 10V.* p<0.005, ***** p<0.0001.....	84
Figure 43 : Spectre XPS concernant toute la gamme des énergies de liaisons accessibles à partir de la source monochromatée MgK α . Ce spectre à grande énergie de passage (200eV) est de faible résolution énergétique et montre la présence de pics caractéristiques des principaux éléments présents à la surface de l'échantillon.	88
Figure 44 : Spectres haute résolution pour les différents éléments retrouvés à l'XPS.	89
Figure 45 : Les atomes de titane sont indiqués en gris et les atomes d'oxygène sont en rouge indiqués ; d'après Xu et al. 2017 (89).	92
Figure 46 : Les atomes de titane sont indiqués en gris et les atomes d'oxygène sont indiqués en rouge. Représentation d'une surface cristalline de TiO ₂ avec des sites où l'eau est adsorbée moléculairement et d'autres où l'eau s'est dissociée en un OH ⁻ (lié à un cation Ti) et un H ⁺ lié à un anion voisin ; d'après Xu et al. 2017 (88).	94
Figure 47: Coupe transversale perpendiculaire plan d'adsorption. Lors d'un pH bas (acide), H ₂ O reste sous sa forme moléculaire avec OH protoné alors qu'en cas de pH haut (basique) il y a une perte de H ⁺ dans la solution laissant place à un O ⁺	95
Figure 48 : Diagramme de prédominance du TiOH des espèces de surface présentes en fonction du pH. En ordonné : % des espèces, en abscisse : le pH.....	96
Figure 49 : Valeurs des pKa des principaux sites échangeurs de protons à la surface de l'oxyde de titane ; d'après Oliva et al. 2003 (96).	96
Figure 50 : Explication de la loi d'atténuation : l'intensité globale émanant de la surface du solide est en réalité une somme des intensités (I ₅ ; I ₄ ; I ₃ ; I ₂) écrantées par le plan supérieur (I ₁).	97
Figure 51 : Composition de représentation moléculaire du collagène (triple hélice à gauche de la figure), d'une des 3 hélices de tropocollagène (au centre) et de la répartition en pourcentage des acides aminés composants ce type de protéine (à droite).....	99
Figure 52 : Spectres infrarouges obtenus en réflexion-absorption montrant l'évolution temporelle de la zone spectrale 900-1880 cm ⁻¹ où se trouvent les bandes amides I, II et III caractéristiques des protéines. Le temps d'immersion total des échantillons dans une solution de collagène de concentration 0.1g.L ⁻¹ est indiqué à droite de chaque spectre. Les séries des échantillons anodisés 10V, 20V et 30V sont représentées pour 2 pH de la solution d'immersion.....	100
Figure 53 : Évolution de l'adsorption de la gélatine sur différentes surfaces de Ti6Al4V SLM anodisées (10V - 20V - 30V) en fonction du temps à différents pH et différents (5 et 8.3). En rouge : Évolution calculée à partir de l'aire sous la bande amide I et en bleu à partir de la somme des aires sous les 3 bandes amides.	101
Figure 54 : Réseau carré compact de NT de diamètres « d ». La densité linéique de sites réactifs sur le bord des tubes est représentée par λ_{lin} et la densité surfacique totale (ensemble des tubes) est σ_{surf}	102
Figure 55 : Survey de l'échantillon anodisé à 10V ayant été immergé 40 min dans la solution de gélatine de pH 8.5, puis rincé à l'eau dé-ionisée et nettoyé 3 minutes par ultra-sons.....	103
Figure 56 : Images de MEB permettant de visualiser où la répartition de la gélatine adsorbée sur un échantillon de Ti6Al4V SLM anodisée à 20 V pendant 1h. L'échantillon a été trempé pendant 20 min dans	

un bain de gélatine à 0.1g.L-1 de pH=8.3 puis passé aux US pendant 5 min avant d'être séché à l'air ambiant puis métallisé avant observation. 105

Figure 57 : Spectres infrarouges obtenus en réflexion-absorption montrant l'évolution temporelle de la zone spectrale 900-1880 cm^{-1} où se trouve les bandes amides I, II et III caractéristiques des protéines pour 2 échantillons contrôle non anodisés obtenus par usinage..... 105

Tableaux

Tableau 1 : Composition pondéral de l'alliage de Ti6Al4V selon la norme ASTM F2924 (29)..... 17

Tableau 2 : Composition de la poudre utilisée selon la fiche de sécurité du fabricant..... 72

Tableau 3 : Gamme de polissage subis par les échantillons pour les observations métallographiques..... 74

Tableau 4 : Présentation des différents échantillons et les paramètres associés..... 76

Tableau 5 : Gamme de polissage subis par les échantillons pour la caractérisation de chimie de surface.... 86

Tableaux 6 : A) Pourcentage des différents éléments. B) Pourcentage des pics O_{1s} et C_{1s} 90

Tableau 7 : Pourcentage des différents éléments à différents pH (acide, neutre et basique) mesurés à l'XPS. 90

Tableau 8 : Décomposition du pic d'oxygène. 91

Tableau 9 : Pourcentage des différents sites présents sur le premier plan de surface. Les % surfaciques expérimentaux sont issus des calculs estimatifs présentés dans le texte pour exploiter la mesure XPS du pic O_{1s} . (*) les % surfacique théoriques reposent sur des calculs faits pour des faces de type (100) et (110) de l'anatase et du rutile ; d'après Connor et al. 1999 (98)..... 98

Tableau 11 : θ_{max} dans ce tableau représente l'intensité de la bande d'absorption de la bande amide I relevée sur les cinétiques de la figure 53. $\theta_{1/2}$, représente le temps d'immersion au bout duquel 50% de l'absorption du plateau est atteinte : c'est le temps de demi-couverture. 102

Tableau 12 : % atomique des différentes espèces détectées par XPS pour les échantillons de Ti6Al4V SLM anodisés à 10V, 20V et 30V. 103

Tableau 13 : % élémentaires des acides aminés composant la gélatine (en jaune) 104

Fiches annexes

Paramètres d'acquisition EBSD :

SLM 20V

Label: EBSD Données de carte 1

Acquis: 05/03/2021 17:19:39

Résolution (Largeur): 2226 pixels

Résolution (Hauteur): 2128 pixels

Taille de pas: 50nm

Largeur de champ: 0.11mm

Hauteur de champ: 0.11mm

Nombre de points: 4736928

Taux d'indexation: 96.5 %

Tension d'accélération: 20.00 kV

Courant 4,0 nA

Distance de travail: 15.5 mm

Distance d'insertion détecteur: 175.9 mm

Temps d'acquisition: 32:26:28

Vitesse d'acquisition: 40.6 Hz

Axe d'inclinaison: Parallèle à X

Inclinaison de l'échantillon (degrés): 70.0°

Mode Regroupement de pixels caméra EBSD: 4x4 (336x256 pixels)

Temps d'exposition caméra EBSD: 20.0 ms

Gain caméra EBSD: 0

Moyennage de clichés: 1 clichés

Correction de bruit de fond statique: On

Correction bruit de fond auto: On

Résolution de Hough: 60

Mode de détection de bande: Centre

Nombre de bandes détectées: 12

Mode d'indexation: Précision améliorée



SLM 30V

Label: EBSD Données de carte 4

Acquis: 04/06/2021 16:52:53

Résolution (Largeur): 2176 pixels

Résolution (Hauteur): 2064 pixels

Taille de pas: 50nm

Largeur de champ: 0.11mm

Hauteur de champ: 0.1mm

Nombre de points: 4491264

Taux d'indexation: 95.2 %

Tension d'accélération: 20.00 kV

Courant 1,5nA

Distance de travail: 13.2 mm

Distance d'insertion détecteur: 175.9 mm

Temps d'acquisition: 18:29:08

Vitesse d'acquisition: 67.5 Hz

Axe d'inclinaison: Parallèle à X

Inclinaison de l'échantillon (degrés): 70.0°

Mode Regroupement de pixels caméra EBSD: 8x8 (168x128 pixels)

Temps d'exposition caméra EBSD: 14.6 ms

Gain caméra EBSD: 0

Moyennage de clichés: 1 clichés

Correction de bruit de fond statique: On

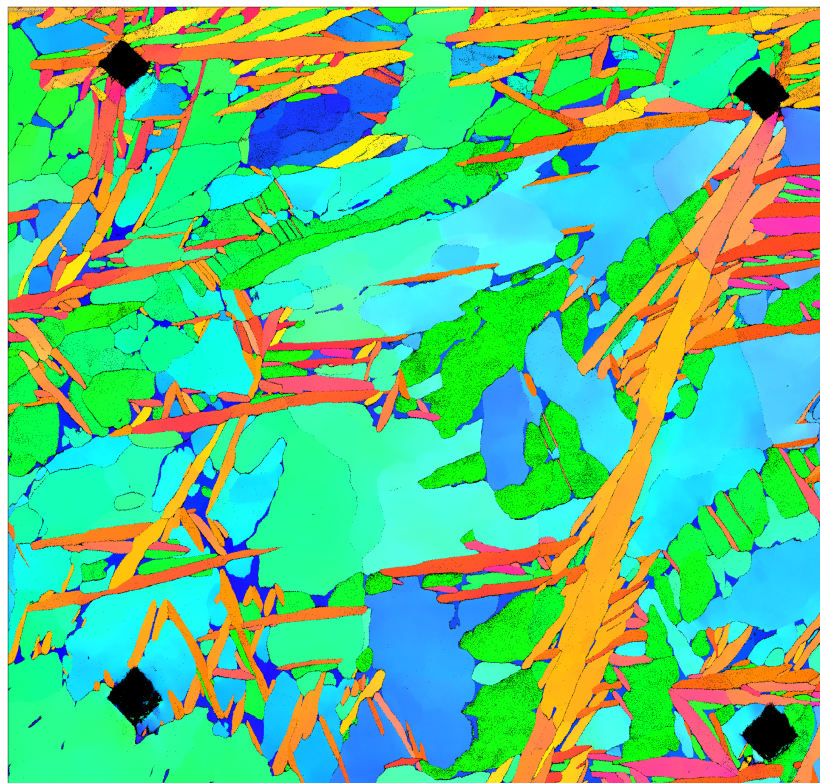
Correction bruit de fond auto: On

Résolution de Hough: 60

Mode de détection de bande: Centre

Nombre de bandes détectées: 12

Mode d'indexation: Précision améliorée



Usiné

Label: EBSD Données de carte 12

Acquis: 21/06/2021 14:53:18

Résolution (Largeur): 960 pixels

Résolution (Hauteur): 721 pixels

Taille de pas: 0.2µm

Largeur de champ: 0.19mm

Hauteur de champ: 0.14mm

Nombre de points: 692160

Taux d'indexation: 91.4 %

Tension d'accélération: 20.00 kV

Courant 1,3nA

Distance de travail: 13.7 mm

Distance d'insertion détecteur: 175.9 mm

Temps d'acquisition: 1:53:23

Vitesse d'acquisition: 101.7 Hz

Axe d'inclinaison: Parallèle à X

Inclinaison de l'échantillon (degrés): 70.0°

Mode Regroupement de pixels caméra EBSD: 8x16 (168x128 pixels)

Temps d'exposition caméra EBSD: 9.6 ms

Gain caméra EBSD: 0

Moyennage de clichés: 1 clichés

Correction de bruit de fond statique: On

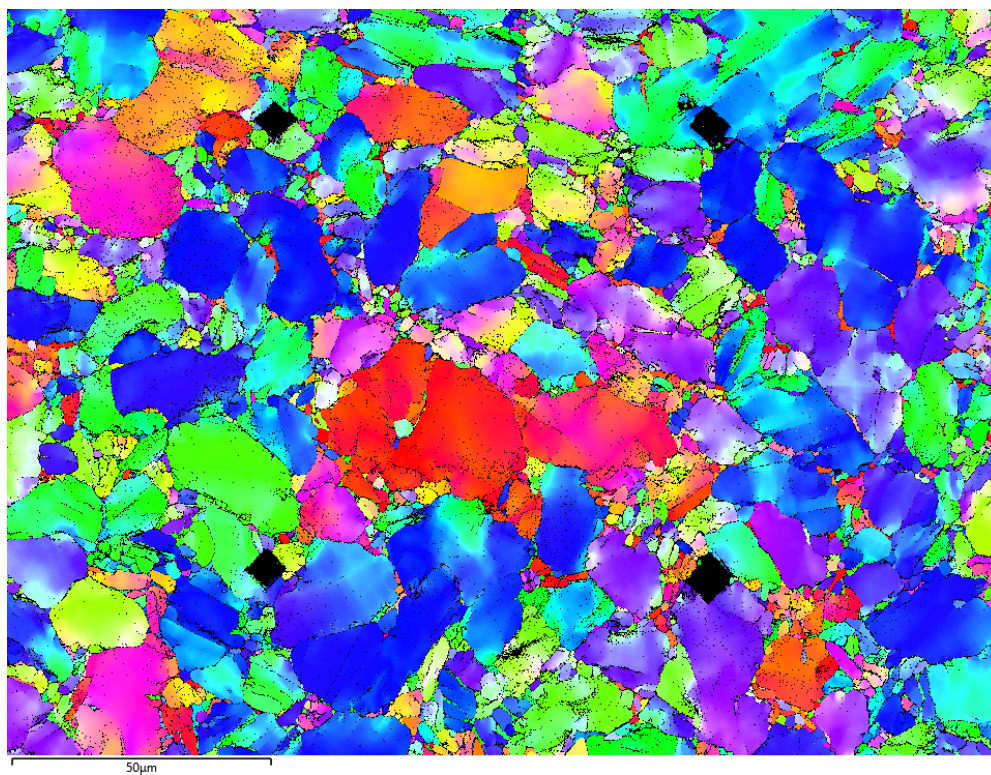
Correction bruit de fond auto: On

Résolution de Hough: 60

Mode de détection de bande: Centre

Nombre de bandes détectées: 12

Mode d'indexation: Précision améliorée



SLM 10V 1h

Label: EBSD Données de carte 14

Acquis: 02/07/2021 15:53:41

Résolution (Largeur): 1026 pixels

Résolution (Hauteur): 764 pixels

Taille de pas: 0.2µm

Largeur de champ: 0.21mm

Hauteur de champ: 0.15mm

Nombre de points: 783864

Taux d'indexation: 94.5 %

Tension d'accélération: 20.00 kV

Courant 1,3nA

Distance de travail: 14.9 mm

Distance d'insertion détecteur: 175.9 mm

Temps d'acquisition: 2:08:23

Vitesse d'acquisition: 101.8 Hz

Axe d'inclinaison: Parallèle à X

Inclinaison de l'échantillon (degrés): 70.0°

Mode Regroupement de pixels caméra EBSD: 8x16 (168x128 pixels)

Temps d'exposition caméra EBSD: 9.6 ms

Gain caméra EBSD: 0

Moyennage de clichés: 1 clichés

Correction de bruit de fond statique: On

Correction bruit de fond auto: On

Résolution de Hough: 60

Mode de détection de bande: Centre

Nombre de bandes détectées: 12

Mode d'indexation: Précision améliorée

